



TRANSMISSÃO DO VÍRUS CITOMEGÁLICO ATRAVÉS DO ALEITAMENTO MATERNO EM PREMATUROS

ANA RITA SILVA GAMA CAMPOS

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

MARÇO 2012



TRANSMISSÃO DO VÍRUS CITOMEGÁLICO ATRAVÉS DO ALEITAMENTO MATERNO EM PREMATUROS

ANA RITA SILVA GAMA CAMPOS

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

ORIENTADOR: PROF. DOUTOR PAULO CRUZ PAIXÃO

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DA FACULDADE DE
CIÊNCIAS MÉDICAS**

MARÇO 2012

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA DISSERTAÇÃO

Breastfeeding And Postnatal Cytomegalovirus Transmission In Preterm Newborns, Ana Campos¹; M. Marçal²; S. Prado²; S. Candeias²; M. Aguiar²; M. Tuna²; O. Campos¹; P. Paixão¹; T. Marques ¹- Poster apresentado no 14th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. Centro de Congressos da Madeira. Funchal, Madeira, 21-24 de Setembro de 2011.

1- Departamento de Microbiologia, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa, Portugal;
2- Unidade de Neonatologia, Hospital de São Francisco Xavier, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Portugal.

AGRADECIMENTOS

A realização de um trabalho desta natureza conduz, obrigatoriamente, ao auxílio e colaboração de pessoas e de instituições, às quais quero demonstrar a minha gratidão e destacar aqueles que mais contribuíram para a sua concretização.

Em primeiro lugar cabe-me agradecer ao Senhor Prof. Doutor Paulo Cruz Paixão, meu orientador, pelo interesse e apoio sempre expressos, desde o início do mestrado e, especialmente, pela confiança e incentivo com que me honrou. A sua contribuição foi decisiva, quer na determinação do tema, nas orientações científicas, metodológicas e bibliográficas, quer ainda na disponibilidade sempre manifestada para os necessários encontros de trabalho, esclarecendo as minhas dúvidas e indecisões. A sua preocupação no acompanhamento das várias fases da dissertação e as sugestões e críticas por ele suscitadas foram determinantes para a levar a bom termo.

Aos Professores do mestrado e à sua coordenadora Senhora Prof.^a Doutora Teresa Marques, uma palavra de gratidão pelas profícuas lições proferidas ao longo do curso e das quais muito beneficiei. Em especial, à Sra. Prof.^a Doutora Luzia Gonçalves, docente do Módulo de Epidemiologia e Bioestatística, pela disponibilidade e esclarecimento de dúvidas relativamente à análise estatística necessária para a elaboração da presente tese.

À Otília Campos, técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas, cumpre-me agradecer a integração, compreensão, apoio e amizade com que me distinguiu no decorrer das técnicas desenvolvidas no laboratório. Aos restantes elementos do Departamento de Microbiologia, Dra. Maria Jesus Chasqueira e Lúcia Rodrigues, pelo apoio e simpatia com que me acolheram.

Aos profissionais de saúde da UCIN do Hospital Francisco Xavier pela colheita dos produtos biológicos para análise e respectivas informações clínicas, um obrigado.

Aos meus colegas de trabalho, pelas inúmeras trocas de turnos necessárias para a elaboração deste trabalho. Aos meus amigos, pela força e motivação que me transmitiram.

Ao meu pai, ao Jorge e à minha mãe, pela educação e formação que me deram, por me inculcarem o espírito de dedicação e perseverança, entre outros valores que regem a minha vida, por sempre confiarem nas minhas capacidades e me fazerem acreditar em mim mesma. Em especial à minha mãe, por estar sempre presente e pelo exemplo que é.

Por último, mas não menos importante, ao amor da minha vida e amigo, pelo apoio incondicional que me reconforta e me dá forças para superar obstáculos, pela tolerância e compreensão nos momentos de má disposição e pelo carinho com que sempre os suportou. Por tudo o que esse apoio representa e que não precisa traduzir-se em palavras, um muito obrigado!

RESUMO

Nas últimas quatro décadas, desenvolveram-se vários estudos, dispersos por todo o mundo, visando analisar a importância da transmissão perinatal do CMV pelo leite materno, nos recém-nascidos prematuros e de baixo peso à nascença. Comparando estes estudos, as taxas de incidência de infecção e doença são extremamente variáveis, não havendo consenso entre os autores. Surgiu, assim, a necessidade de realizar a presente dissertação, pioneira ao nível nacional, com o objectivo de determinar a incidência da infecção perinatal citomegálica, transmitida através do aleitamento materno a recém-nascidos prematuros, e identificar as suas consequências clínicas.

Para a elaboração deste trabalho foram seleccionados todos os recém-nascidos com idade gestacional inferior a 35 semanas e respectivas mães seropositivas para CMV, internados na Unidade de Cuidados Intensivos de Neonatologia do Hospital de São Francisco Xavier, entre o período de 1 de Outubro de 2010 e 31 Julho de 2011.

Foram analisadas as urinas dos recém-nascidos e o leite materno das mães na primeira, sexta e décima segunda semana pós-parto, utilizando a técnica de *Nested-PCR* e, posteriormente, a PCR em Tempo Real, para determinar a carga viral do leite materno.

Constatou-se que a aquisição da infecção perinatal de CMV no recém-nascido prematuro ocorre com alguma frequência (40,5%), sendo muito provável que a via de transmissão em 38,1% destes casos seja o leite materno infectado, não devendo esta ser desvalorizada. Relativamente às consequências clínicas, não foram observadas alterações clínico-laboratoriais associadas à infecção citomegálica.

Analizando os factores que condicionam a transmissão da infecção citomegálica perinatal, estabeleceu-se uma correlação entre a carga viral do leite materno e a transmissão do vírus, permitindo deduzir que quanto maior a carga viral, maior o risco de transmissão.

Finalmente, os resultados obtidos sugerem que o risco de transmissão da infecção e suas consequências clínicas não justificam a contra-indicação da amamentação, pois esta comporta, também, elevados benefícios.

ABSTRACT

In the last four decades, several studies were developed all over the world to analyze the importance of CMV perinatal transmission through mother's milk in the preterm and low birthweight newborns. Comparing these studies, the infection and disease incidence rates are extremely variable, without agreement between the authors. The aim of this study, the first of the kind made in Portugal, is to define the rate of perinatal cytomegalovirus infection in preterm newborns via breastfeeding and its clinical consequences.

All the newborns with gestational age below 35 weeks and their CMV seropositive mothers, admitted between the October 1, 2010 and July 31, 2011 in the Neonatology Intensive Care Unit of the São Francisco Xavier Hospital, were included in this study.

Human breast milk and urine specimens were collected from mothers and their preterms infants around the 1st, 6th and 12th week after delivery and analyzed by *Nested-PCR*. The PCR in Real Time was used to determine the breast milk viral load.

It was found that the CMV perinatal infection in preterm infants occurs in 40,5% of the cases and most likely 38,1% of these were infected via breastmilk and therefore this should not be overlooked. Considering the clinical consequences, no clinical and laboratory changes associated with cytomegalovirus infection were observed.

Analyzing the factors that determine the perinatal transmission of the cytomegalovirus, it was established a correlation between breast milk viral load and viral transmission, allowing to conclude that the higher the viral load the greater the risk of transmission.

Finally, the obtained results suggest that the risk of CMV infection and its clinical consequences don't justify the breastfeeding contraindication because it also provides high benefits.

ÍNDICE

	Página
Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1 Breve contextualização histórica.....	2
1.2 Família <i>Herpesviridae</i>	3
1.3 Vírus Citomegálico Humano (CMV).....	7
1.4 Epidemiologia.....	9
1.5 Formas de transmissão.....	10
1.6 Manifestações clínicas.....	12
1.6.1 Infecção nos indivíduos imunocompetentes.....	12
1.6.2 Infecção nos indivíduos imunodeprimidos.....	13
1.6.2.1 Infecção no doente submetido a transplante.....	13
1.6.2.2 Infecção nos doentes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH).....	14
1.6.3 Infecção congénita.....	15
1.6.4 Infecção perinatal.....	16
1.6.4.1 Leite materno como veículo de transmissão para infecção citomegálica no recém-nascido prematuro.....	17
1.7 Métodos de diagnóstico.....	20
1.7.1 Citologia.....	21
1.7.2 Isolamento do vírus por cultura celular.....	21

1.7.3 Técnica de antigenémia.....	22
1.7.4 Testes serológicos.....	22
1.7.5 Detecção dos ácidos nucleicos virais.....	23
1.8 Diagnóstico das infecções verticais.....	26
1.9 Tratamento e prevenção das infecções citomegálicas adquiridas através do leite materno.....	27
Capítulo 2. Materiais e Métodos.....	31
2.1 População e amostras.....	32
2.2 Pesquisa de IgG para CMV.....	33
2.3 Pesquisa de ADN de CMV.....	33
2.3.1 Preparação das amostras.....	33
2.3.2 Extracção de ADN.....	34
2.3.3 Amplificação de fragmentos ADN por <i>Nested</i> -PCR.....	35
2.3.4 Detecção dos produtos de amplificação.....	38
2.3.5 Técnica de PCR em Tempo Real.....	39
Capítulo 3. Resultados.....	45
3.1 Resultados da detecção de CMV na urina dos lactentes.....	47
3.2 Resultados qualitativos da pesquisa de CMV no leite materno.....	49
3.3 Relação entre os resultados das urinas dos lactentes e do leite materno das respectivas mães.....	51

3.4 Resultados quantitativos da detecção de CMV no leite materno.....	51
3.4.1 Curvas de calibração e variação intra e inter-ensaios.....	52
3.4.2 Evolução da excreção viral no leite materno.....	54
3.4.3 Carga viral do leite materno e transmissão de infecção perinatal CMV.....	55
3.5 Caracterização do grupo de lactentes infectados e não infectados com CMV.....	59
3.6 Manifestações clínicas.....	64
Capítulo 4. Discussão e Conclusões.....	66
Capítulo 5. Referências Bibliográficas.....	79
Anexos.....	98
Anexo 1.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Figura 1 – Efeito Citopático do Vírus Citomegálico Humano.....	2
Figura 2 – Estrutura de um virião pertencente à família <i>Herpesviridae</i>	4
Figura 3 – Vírus Citomegálico Humano.....	7
Figura 4 – Esquema da organização do genoma do CMV.....	8
Figura 5 – Diferentes fases da técnica de PCR.....	24
MATERIAL E MÉTODOS	
Figura 6 – Esquema do método de PCR em Tempo Real.....	39
Figura 7 – Ciclos de amplificação da PCR em tempo real.....	41
Figura 8 – Curva de amplificação da PCR-TR.....	42
Figura 9 – Construção da curva de calibração.....	43
RESULTADOS	
Figura 10 - Resultados dos testes serológicos.....	46
Figura 11 – Detecção do ADN do CMV nas urinas do total de 60 lactentes, através da técnica de <i>Nested-PCR</i>	48
Figura 12 – Evolução de excreção do CMV no leite materno através dos resultados da detecção do ADN de CMV no leite materno pela técnica de diagnóstico <i>Nested-PCR</i>	50
Figura 13 – Gráficos das curvas de calibração utilizadas na quantificação do CMV e respectivos valores do declive e eficiência.....	52
Figura 14 – Relação entre a carga viral do leite materno na 1ª semana pós-parto entre as mães transmissoras e as não transmissoras de infecção perinatal	

de CMV aos respectivos filhos.....	53
Figura15 – Relação entre a carga viral do leite materno na 6ª semana pós-parto entre as mães transmissoras e as não transmissoras de infecção perinatal de CMV aos respectivos filhos	56
Figura 16 – Relação entre a carga viral do leite materno na 12ª semana pós-parto entre as mães transmissoras e as não transmissoras de infecção perinatal de CMV aos respectivos filhos	58
Figura 17 – Comparação da excreção de CMV no leite materno entre as mães transmissoras e não transmissoras, ao longo do estudo.....	59

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Tabela 1 – Vírus da família <i>Herpesviridae</i> patogénicos para o Homem.....	6
MATERIAL E MÉTODOS	
Tabela 2 – Descrição das sequências oligonucleotídicas dos <i>primers</i> externos, utilizados na 1ª reacção de amplificação da <i>Nested-PCR</i>	36
Tabela 3 – Descrição das sequências oligonucleotídicas dos <i>primers</i> internos, utilizados na 2ª reacção de amplificação da <i>Nested-PCR</i>	37
Tabela 4 – Descrição das sequências oligonucleotídicas dos <i>primers</i> e sonda utilizados na PCR em Tempo Real.....	41
RESULTADOS	
Tabela 5 – Detecção de ADN do CMV nas urinas dos recém-nascidos na 1ª semana de vida, através da técnica de <i>Nested-PCR</i> , para exclusão de infecção citomegálica congénita.....	47
Tabela 6 – Detecção de ADN do CMV nas urinas dos lactentes na 6ª e 12ª semana de vida, através da técnica de <i>Nested-PCR</i>	48
Tabela 7 – Detecção de ADN do CMV nos leites maternos na 1ª, 6ª e 12ª semana pós-parto, através da técnica de <i>Nested-PCR</i>	49
Tabela 8 – Valores de desvio-padrão, média e coeficiente de Variação Intra-ensaio de duas sessões de PCR-TR distintas (denominadas como A e B).....	53
Tabela 9 – Valores do desvio-padrão, média e coeficiente de variação Inter-ensaio (A e B).....	53
Tabela 10 – Média, mediana, mínimos e máximos dos resultados quantitativos do leite materno na primeira, sexta e décima segunda semana pós-parto.....	54
Tabela 11 – Características antropométricas, obstétricas e tempo de internamento na UCIN dos lactentes com e sem infecção perinatal.....	60
Tabela 12 – Factores de risco para transmissão de infecção por CMV.....	61

Tabela 13 – Relação entre a infecção perinatal de CMV e a idade gestacional (IG) dos lactentes.....	62
Tabela 14 – Relação entre a infecção perinatal de CMV e o peso à nascença dos lactentes.....	63
Tabela 15 – Relação entre a infecção perinatal de CMV e a duração do aleitamento materno, nos casos em que ocorre excreção viral.....	64
Tabela 16 – Relação entre a infecção perinatal de CMV e a neutropénia, nos casos em que ocorre excreção viral.....	65

SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

CHLO - Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental

CMV - Vírus Citomegálico Humano

Ct – Cycle Threshold

DNAses- Desoxirribonucleases

dNTPs – Desoxinucleósidos Trifosfatos

ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay

HAART – Highly Active Antiretroviral Therapy

HCl - Cloreto de Hidrogénio

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IG – Idade Gestacional

IGIV - Imunoglobulina Intravenosa

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

IR - Segmentos de repetição internos

KCl – Cloreto de Potássio

MGB - *Minor Groove Binding*

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

ORF - *Open Reading Frames*

Pb – Pares de base

PCR - Reacção em Cadeia da Polimerase

PCR-TR - Reacção em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RNAses - Ribonucleases

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

TR – Segmentos de repetição terminais

UCIN - Unidade de Cuidados Intensivos de Neonatologia

UL – Sequência única longa

US – Sequência única curta

UV – Ultravioleta

1- INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve contextualização histórica

No ano de 1881, um grupo de cientistas alemães notificou células grandes com inclusões intranucleares do tipo “olho de coruja” (figura 1) em tecidos de fetos, anteriormente nunca descritas (64). Estas inclusões intranucleares foram interpretadas como sendo resultado de uma infecção por protozoários tendo sido, inclusive, proposto no ano de 1910 a denominação de *Entamoeba mortinatalium* para este agente (54).

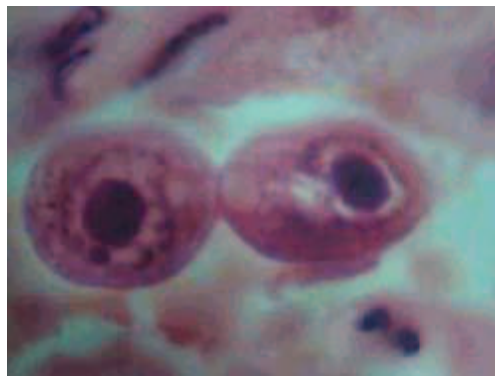


Figura 1 – Efeito Citopático do Vírus Citomegálico Humano (adaptado de **Griffiths, Paul D.** 2009. Cytomegalovirus, p.161-198. In Arie Zuckerman, JanguBanatvala, Barry Schoub, Paul Griffiths, Philip Mortimer (ed.), Principles and Practice of Clinical Virology, 6ª ed., Wiley-Blackwell, Oxford).

No ano de 1932, foram descritos 25 casos de infecção congênita letal em crianças com sintomas como petéquias, hepatoesplenomegália e calcificações intracerebrais que tinham em comum a presença de células com inclusões intranucleares típicas. Com base neste evento, Wyatt denominou esta infecção por doença de inclusão citomegálica (64).

Apenas no ano de 1956 foi descoberta a etiologia viral do Vírus Citomegálico Humano (CMV), quando três laboratórios em simultâneo conseguiram isolar com sucesso CMV em culturas celulares. Assim, este agente viral ficou maioritariamente conhecido por *Cytomegalovirus* pelo seu efeito citopático nas células em cultura (54).

Nas décadas seguintes, obtiveram-se grandes avanços no que respeita ao conhecimento acerca deste vírus e respectivas repercussões no ser humano, facto este, que se deve, principalmente, ao desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e aos ensaios clínicos realizados para estudo dos agentes antivirais (81).

Assim, ao longo dos anos, o CMV foi ganhando protagonismo na área da investigação, já que este vírus demarcou-se pelo facto de ser um dos grandes responsáveis por infecções oportunistas em doentes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e cancro, por infecções de doentes receptores de órgãos transplantados e, simultaneamente, o maior agente viral causador de atraso mental e surdez como sequelas de infecção congénita (122).

Actualmente, este vírus é reconhecido pelo *Internacional Committee on Taxonomy of Viruses* como Vírus do herpes humano tipo 5, sendo igualmente aceite a designação de HHV-5, Vírus Citomegálico Humano (HCMV) ou Citomegalovírus Humano (CMV). Este mesmo comité classificou CMV como um membro da família *Herpesviridae*, subfamília dos *Betaherpesvirinae* (139).

1.2 Família *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae* é constituída por vírus com genoma de grandes dimensões, entre cerca de 120-230 kb, com invólucro e ácido desoxirribonucleico (ADN) em cadeia dupla. Todos estes vírus apresentam características semelhantes no que respeita à estrutura do virião, à estratégia replicativa e à sua capacidade de estabelecer infecções latentes e recorrentes no hospedeiro (139).

Relativamente à estrutura e morfologia do virião, os herpesvírus apresentam ADN linear, de cadeia dupla, envolvido por uma camada protectora, designada por cápside. Esta tem uma estrutura icosaédrica, sendo constituída por 162 capsómeros, hexagonais e pentagonais. Outra característica relevante nos herpesvírus é o facto de apresentarem um invólucro, composto pela membrana nuclear alterada da célula infectada e por várias glicoproteínas virais. Entre o invólucro e a cápside encontra-se o tegumento que é constituído por enzimas e proteínas virais, necessárias para iniciar a replicação (125).

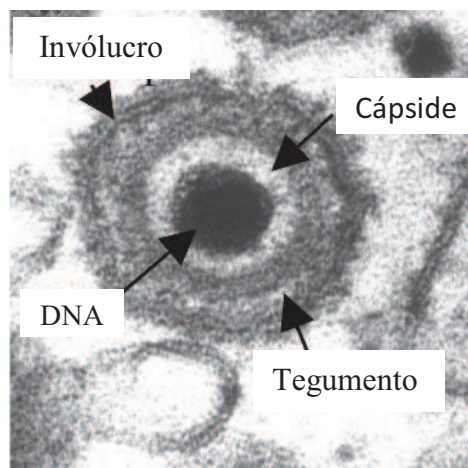


Figura 2 – Estrutura de um viriã pertencente à família *Herpesviridae* (adaptado de **Gibson, W.** 2008. Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion, p. 187-204. In Shenk Thomas, Mark Stinski (editors), Human Cytomegalovirus, Springer, Berlin).

A replicação dos vírus da família *Herpesviridae* é iniciada pela interação das glicoproteínas virais com os receptores celulares de superfície. Ocorre então a fusão do invólucro viral com a membrana citoplasmática celular, permitindo a migração da nucleocápside para o citoplasma celular. Enzimas e factores de transcrição (α -TIF) são transportados para o interior da célula dentro do tegumento do viriã. Posteriormente, a nucleocápside é transportada até aos poros da membrana nuclear libertando o genoma viral para o interior do núcleo celular, onde o genoma sofre a replicação e transcrição (139).

No caso particular dos *Herpesviridae*, a transcrição do ADN viral e síntese das proteínas virais é assegurada pela Polimerase II celular e compreende 3 etapas: precoce imediata, precoce e tardia.

Resumidamente, a primeira fase é coordenada por duas proteínas virais, a VHS, que inibe a síntese de proteínas celulares, e a α -TIF, que promove a iniciação da transcrição dos genes α e respectiva tradução, permitindo, desta forma, a síntese de proteínas de regulação. Estas desempenham um papel determinante na manutenção da transcrição e na inibição da resposta da célula à infecção.

Na fase precoce, ocorre a transcrição dos genes β , responsáveis pela síntese de enzimas necessárias para a replicação do ADN viral, entre as quais, a ADN polimerase, a primase/helicase, a timidina-cinase. É nesta fase que se dá o início da replicação do ADN viral.

Na fase tardia, assiste-se à transcrição dos genes de expressão tardia (γ), responsáveis pela síntese de proteínas estruturais. Segue-se a encapsidação do genoma viral e a formação do tegumento, processos estes que se realizam no núcleo da célula hospedeira. Uma vez formadas as nucleocápsides, estas dirigem-se para fora do núcleo, adquirindo o invólucro ao atravessar a membrana nuclear e membrana intracitoplasmática do aparelho de Golgi. A libertação dos viriões da célula hospedeira ocorre através do processo de exocitose (84, 139).

Todo este processo funciona como uma cascata, ou seja, o ciclo de replicação dos herpesvírus caracteriza-se por uma sucessão de eventos cujas diferentes fases dependem sempre da fase antecessora (123).

Os *Herpesviridae* são também distinguidos pela sua capacidade de se instalarem de forma vitalícia no hospedeiro. Após a infecção primária, que pode ser sintomática ou assintomática, estes vírus conseguem manter um estado de latência que consiste em preservar informação viral em determinadas células, sob a forma de ADN, nos gânglios nervosos sensitivos. Esta fase de latência pode ser reactivada devido a factores intrínsecos (stress emocional ou físico, período menstrual, gravidez, imunodepressão, febre, etc.) e factores extrínsecos (radiações ultravioletas, radioterapia, quimioterapia, etc.).

A família *Herpesviridae* engloba três subfamílias que diferem entre si nas características do vírus (estrutura do genoma, tropismo celular e localização da infecção latente), tal como, na patogénese da doença e respectivas manifestações clínicas.

Tabela 1 – Vírus da família *Herpesviridae* patogénicos para o Homem (adaptado de **Lourenço, Maria Helena**. 2002. Capítulo 7- Herpesvírus Humano. p.83-111. In W. Ferreira e J. Sousa (ed.), Microbiologia, vol.3. Edições Lidel, Lisboa).

Subfamília	Género	Espécie	Nome Comum
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexviruses</i>	Vírus do herpes humano 1	Vírus do herpes simples 1
		Vírus do herpes humano 2	Vírus do herpes simples 2
	<i>Varicellavirus</i>	Vírus do herpes humano 3	Vírus da varicela e da zona
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Vírus do herpes humano 5	Vírus citomegálico humano
	<i>Roseolovirus</i>	Vírus do herpes humano 6	
		Vírus do herpes humano 7	
<i>Gammapherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Vírus do herpes humano 4	Vírus de Epstein-Barr
	<i>Rhadinovirus</i>	Vírus do herpes humano 8	

De uma forma sucinta, a subfamília *Alphaherpesvirinae* reúne vírus neurotrópicos. Apresenta ciclos replicativos curtos (cerca de 18 horas), disseminação rápida em cultura de células, com capacidade de destruir com eficiência as células infectadas. Estes vírus têm a capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros.

A subfamília *Betaherpesvirinae* inclui vírus linfotrópicos com ciclos replicativos longos. Apresenta uma gama de hospedeiros restrita e, geralmente, as células infectadas aumentam de dimensão (citomegália). O desenvolvimento da infecção em células de cultura é lento. O vírus pode manter-se na forma latente em glândulas secretoras, rins e outros tecidos.

A subfamília *Gammapherpesvirinae* compreende vírus com ciclos replicativos relativamente longos. Têm a capacidade de replicarem em células linfoblastóides, sendo que a maioria pode causar infecções líticas em células epiteliais e fibroblásticas. Os vírus deste grupo são específicos para linfócitos T ou B.

1.3 Vírus Citomegálico Humano

O CMV possui o maior genoma de todos os vírus de herpes humano (30).

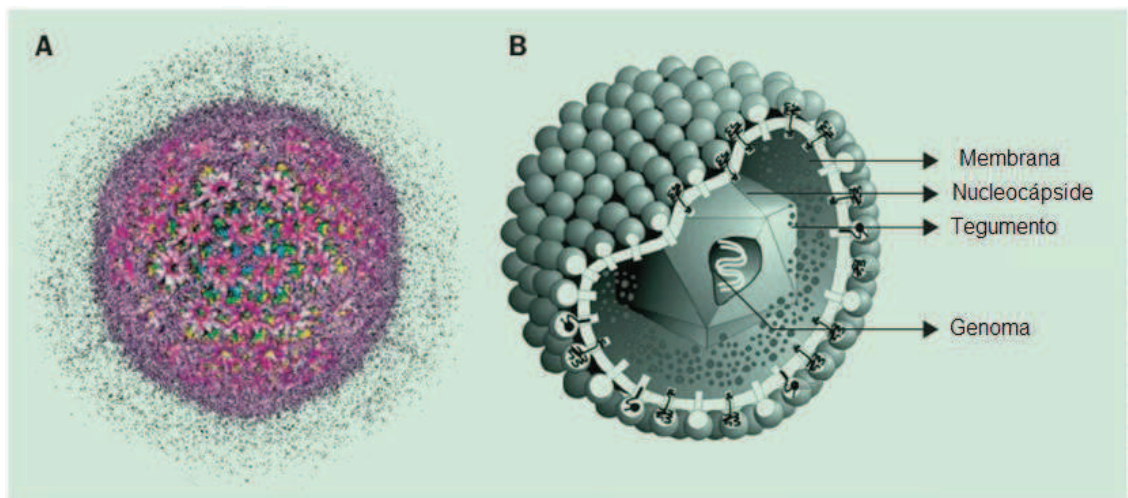


Figura 3 – Vírus Citomegálico Humano. (A) Visualização tridimensional da cápside/tegumento do vírus; (B) Modelo Tridimensional, mostrando vários componentes do vírus (adaptado de **Gandhi, Maher, Rajiv Khanna**. 2004. Human Cytomegalovirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Treatments. The Lancet.4: 725-738).

Tal como os outros membros da família *Herpesviridae*, o CMV é constituído por uma nucleocápside (conjunto do genoma viral e da cápside), tegumento e envoltório. O CMV apresenta uma nucleocápside icosaédrica de 100-110nm de diâmetro, cujo material

genético é composto por ADN de cadeia dupla linear, com aproximadamente, 230 Kilobases.

A cápside é constituída por 12 capsómeros pentavalentes e 150 capsómeros hexavalentes designados, respectivamente, por pentâmeros e hexâmeros. O invólucro tem cerca de 10 nm de espessura e é composto por uma bicamada lipídica, que contém aproximadamente 8 tipos diferentes de glicoproteínas virais (54). Estas desempenham importantes funções, tais como, a adesão e entrada do vírus nas células hospedeiras.

O genoma do CMV é constituído por duas regiões, segmento longo do genoma (L) e segmento curto do genoma (S). Cada segmento é composto por uma região central única, designada por sequência única longa, ou *unique long sequence* (UL), e sequência única curta, ou *unique short sequence* (US), e por segmentos de repetição invertidos. Tal como se pode visualizar na figura abaixo, estes segmentos invertidos encontram-se na extremidade de cada região central única. Os que se encontram na extremidade final do genoma completo, designam-se por segmentos de repetição terminais (TR), por sua vez, os que se encontram na intersecção das regiões centrais únicas, designam-se por segmentos de repetição internos (IR). Os segmentos de repetição funcionam como origens de replicação do genoma (98).



Figura 4 – Esquema da organização do genoma do CMV: (UL) sequências longas; (US) sequências curtas; (TRL) segmento de repetição terminal da sequência longa; (IRS) segmento de repetição terminal da sequência curta; (IRL) segmento de repetição interno da sequência longa; (IRS) segmento de repetição interno da sequência curta. (adaptado de **Kotenko, S. V., S. Saccani, L. Izotova, O. Mirochnitchenko, S. Pestka.** 2000. Human Cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog. Proc National Academic Science. 97: 1695-1700).

Desta forma, tanto as sequências longas (UL), como as curtas (US), podem ser orientadas em duas direcções e de forma independente uma da outra, podendo dar origem a quatro isómeros de ADN. Os genes estão numerados de acordo com a sua

posição nos isómeros, sendo que as proteínas por eles transcritas são denominadas por *p* (proteína), *gp* (glicoproteína) ou *pp* (fosfoproteína). Por exemplo, a gpUL75 é uma glicoproteína produzida na posição 75 da sequência longa (120).

O genoma do CMV encontra-se totalmente sequenciado para a estirpe AD169, desde o ano de 1990, estimando-se um número de *Open Reading Frames* (ORF's) entre 200-250.

Apesar do CMV apresentar um ciclo de replicação semelhante ao dos restantes herpesvírus, descrito anteriormente, este vírus apresenta algumas características próprias que o distingue dos outros e que permite categorizá-lo na subfamília *Betaherpesvirinae*, nomeadamente, o facto de ser altamente específico de espécie e de apresentar um ciclo de replicação longo, cerca de 24 horas. (54, 139)

O CMV tem a capacidade de infectar uma grande diversidade de células *in vivo*, tais como, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e musculares, enquanto *in vitro* é muito restrito, multiplicando-se preferencialmente em fibroblastos humanos. Nestas células, a replicação viral resulta na formação de corpos de inclusão intranucleares homogéneas reniformes, geralmente eosinófilas, e de inclusões intracitoplasmáticas, provocando um grande aumento do volume total da célula (122, 123).

O CMV pode ser destruído, quer por agentes físicos, tais como, calor, radiações UV, pH menor que 5, ciclos de congelação e descongelação, e por determinados agentes químicos, tais como, detergentes iónicos e não iónicos, solvente dos lípidos, etc.

1.4 Epidemiologia

O CMV é um vírus com uma distribuição mundial, sem predomínio sazonal, variando a sua seroprevalência consoante diversos factores epidemiológicos tais como a idade, a distribuição geográfica, estado socioeconómico, entre outros. Estima-se que entre 50 e 90% da população mundial apresenta anticorpos IgG-CMV (131).

Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência do CMV é inversamente proporcional às condições socioeconómicas da população, ou seja, a taxa de infecção por CMV é geralmente maior nos países subdesenvolvidos em comparação com os países desenvolvidos (71, 157).

Em populações com baixas condições socioeconómicas, a maioria das crianças já experienciaram infecção primária de CMV até a instalação da puberdade. Nos países com elevado nível socioeconómico, cerca de 40% dos adolescentes encontram-se infectados, havendo posteriormente um aumento de seroprevalência de cerca de 1% por ano depois da adolescência (54). Sendo assim, constata-se que geralmente nos grupos socioeconómicos mais baixos há uma seroprevalência mais elevada e a primoinfecção ocorre mais cedo (83).

O CMV destaca-se por ser o maior causador de infecção congénita, atingindo taxas entre 0,2 a 2,6% do total de nascimentos no mundo, sendo responsável por casos de mortalidade e morbilidade neonatal (158).

Em Portugal, no âmbito do Inquérito Serológico Nacional - Portugal Continental, constatou-se que a infecção pelo CMV é altamente prevalente, tendo-se registado uma seroprevalência de 77% no ano de 2005 (83). Relativamente à prevalência da infecção congénita por CMV em Portugal, de acordo com um estudo de 2009 baseado na pesquisa de ADN viral nos cartões de diagnóstico precoce ou *Guthrie Cards* (designados na linguagem corrente como cartões do “teste do pézinho”), verificou-se que esta corresponde a 1,05%, o que, comparada com as taxas de prevalência de outros países europeus (entre os 0,3 a 0,5%), é bastante elevada (114).

1.5 Formas de transmissão

O único reservatório de transmissão do CMV é o Homem, sendo as várias estirpes de CMV encontradas noutras espécies animais não infecciosas para o ser humano (158).

O CMV pode ser transmitido através do contacto directo ou indirecto com os fluidos corporais, tais como a saliva, sangue, colostro, leite materno, secreções cervicais, sêmen

e urina. O vírus pode estar presente nestes fluidos durante a infecção primária, reinfecção ou reactivação (54, 88, 91, 99, 140).

O CMV pode ser adquirido em qualquer idade, no entanto, existem dois períodos de maior prevalência de infecção primária que correspondem à fase da infância, durante o período perinatal, e da adolescência, devido ao início da actividade sexual (157).

O CMV é um vírus com transmissão vertical, por via transplacentária, em qualquer fase da gestação, ou durante a passagem pelo canal de parto, através do contacto com as secreções cervicais. A transmissão congénita pode ser resultado de uma infecção primária de uma gestante seronegativa para CMV, mas também de uma reactivação de uma infecção latente de uma gestante seropositiva para CMV ou de uma reinfecção, embora estes casos sejam mais raros (52).

A transmissão pode também ocorrer após o parto, quer através da amamentação, quer através da saliva, que representa a via de transmissão mais frequente na infância. Para além da transmissão vertical e oral, outras formas de transmissão possíveis são a via sexual, a via parentérica e, ainda, através da transplantação de órgãos sólidos ou de células do sistema hematopoiético (43, 52).

O CMV é um vírus que tem grande potencial para proliferar entre os seres humanos por diversas razões. O facto de a sua infecção ser geralmente subclínica, permite que os indivíduos infectados permaneçam activos e, desta forma, se mantenha a máxima oportunidade de ir ao encontro de outros indivíduos susceptíveis e infectá-los. Outra justificação para este potencial é o facto de que, após a infecção primária, o vírus não é erradicado do hospedeiro, permanecendo no seu organismo para o resto da sua vida. Assim, ocasionalmente, o CMV pode reactivar do seu estado de latência e consequentemente ocorrer novamente expressão total do genoma viral, podendo ser novamente transmitido. Para além disso, estes hospedeiros, apesar de infectados não adquirem imunidade uma vez que estes podem vir a sofrer nova infecção por este vírus através de estirpes diferentes (54).

Outra possível explicação para a fácil propagação do CMV é o facto da sua excreção poder persistir durante um período de tempo prolongado. Por exemplo, sabe-se que no

caso de infecções congénitas, a excreção viral pode ter uma duração de anos, aumentando assim a probabilidade de transmissão a outros indivíduos (139).

Desta forma, podemos concluir que existem três formas activas de infecção por CMV nomeadamente, a infecção primária, a reactivação e a reinfeção. A infecção primária consiste no primeiro contacto do vírus com o hospedeiro. A reactivação, também designada por infecção endógena, ocorre quando o indivíduo seropositivo para CMV sofre nova infecção como resultado da reactivação do estado de latência do vírus. Quanto à reinfeção, ou reinfeção exógena, ocorre quando um indivíduo previamente seropositivo para CMV é novamente infectado por diferentes estirpes do vírus (73, 148).

1.6 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da infecção por CMV variam de acordo com o estado imunitário do hospedeiro e com a forma de contaminação do indivíduo (84).

1.6.1 Infecção nos indivíduos imunocompetentes

A infecção provocada pelo CMV nos indivíduos imunocompetentes é, na sua grande maioria, assintomática (73, 148). Contudo, nalguns casos pode surgir uma síndrome semelhante à Mononucleose Infecciosa provocada pelo vírus de Epstein-Barr, mas sem anticorpos heterófilos (Reacção de Paul-Bunnell-Davidsohn negativa) (140). O síndrome provocado pelo CMV é caracterizado por febre prolongada, astenia, cefaleias e mialgias (que podem persistir durante semanas) e hepato e/ou esplenomegália (91, 148). Faringite e adenopatias são encontradas excepcionalmente, ao contrário do que se verifica na Mononucleose Infecciosa provocada pelo vírus de Epstein-Barr (9).

A infecção por CMV também tem sido associada a outras alterações clínicas como a Síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalites, miocardite, anemia hemolítica e trombocitopenia (140, 148).

1.6.2 Infecção nos indivíduos imunodeprimidos

A infecção por CMV, quer seja infecção primária, reactivação ou reinfeção, representa uma importante causa de mortalidade e morbilidade nos indivíduos com sistema imunitário debilitado (88)

A infecção por CMV nos indivíduos imunodeprimidos pode originar diversos quadros clínicos nos diferentes tipos de doentes, sendo também o grau de gravidade proporcional ao grau de imunodepressão (148).

Infecções por CMV ocorrem com elevada frequência em indivíduos sob imunossupressão (por exemplo, doentes com neoplasias malignas), em doentes transplantados e em doentes portadores do Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (148).

1.6.2.1 Infecção no doente submetido a transplante

A infecção por CMV é a mais comum no percurso pós-transplantação de órgãos. Nos doentes transplantados de órgãos sólidos, a infecção apresenta maior prevalência nos primeiros três meses pós-transplante, fase em que a imunossupressão, causada pela terapêutica para prevenção de rejeição de órgão, é mais elevada (72).

O CMV é essencialmente transmitido através do órgão transplantado ou dos produtos sanguíneos, embora neste último caso, se tenha verificado uma diminuição em grande escala da prevalência da infecção por CMV desde o início da utilização de estratégias preventivas, como a transfusão de produtos sanguíneos seronegativos ou desleucocitados nos receptores negativos (145).

A prevalência da infecção sintomática por CMV também difere consoante o órgão transplantado, sendo que os doentes transplantados renais apresentam uma incidência de doença por CMV inferior aos transplantados de fígado, pâncreas, pulmão, intestino e coração (64, 71).

Outro factor que condiciona o risco de desenvolvimento de doença por CMV, nos doentes submetidos a transplantação, é o estado imunitário do dador e do receptor.

Assim, nos doentes transplantados podem existir três tipos de infecção: a infecção primária, quando um indivíduo seronegativo para CMV desenvolve infecção após transplante de órgão de um dador seropositivo; a reactivação, que ocorre quando o vírus latente reactiva na fase pós transplante, num doente seropositivo para CMV; e a reinfeção, quando o receptor seropositivo para CMV recebe do órgão de um dador seropositivo uma nova estirpe de CMV, desenvolvendo uma infecção (81). A infecção primária surge como sendo a mais patogénica para o indivíduo transplantado (43, 64).

No doente transplantado, a infecção por CMV é muito variável, podendo surgir como uma infecção assintomática, infecção ligeira ou moderada, ou mesmo uma infecção grave e potencialmente letal. A infecção ligeira ou moderada é geralmente caracterizada pela presença de febre alta (superior a 38°C), leucopenia ou trombocitopenia (81).

Estudos histológicos demonstraram que a doença associada ao vírus de CMV tem, inicialmente, como alvo principal o próprio órgão transplantado, podendo posteriormente difundir-se de modo sistémico, causando pneumonia, hepatite, colite e raramente retinite ou alterações do sistema nervoso central (43, 148).

No caso dos receptores de medula óssea, a doença provocada pelo CMV manifesta-se de forma diferente, surgindo frequentemente uma pneumonia intersticial, com alta taxa de mortalidade, e complicações gastrointestinais, nomeadamente, gastrite, colite e esofagite (38).

O CMV está também associado a efeitos indirectos, que consistem na rejeição do órgão transplantado e na imunossupressão, originando um aumento da susceptibilidade do hospedeiro a infecções secundárias provocadas por bactérias e fungos (81, 148).

1.6.2.2 Infecção nos doentes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O CMV é um dos mais importantes agentes virais causadores de doenças oportunistas nos doentes com HIV, embora com menor incidência desde a introdução da terapêutica antiretroviral de elevada eficácia (HAART – *highly active antiretroviral therapy*), uma

combinação de três ou mais drogas antiretrovirais de pelo menos duas classes diferentes (17, 93).

O risco de infecção por CMV nos doentes infectados com HIV é inversamente proporcional ao número de células CD4. Neste grupo, ao contrário dos doentes transplantados, a manifestação clínica mais frequente de doença por CMV é a retinite (caracterizada por necrose hemorrágica da retina), tendo sido inclusive, entre os anos de 1981 e 1989, usada como critério para diagnóstico definitivo de SIDA (43, 71). Outras possíveis manifestações clínicas atribuídas à infecção por CMV nos doentes com HIV incluem a esofagite, colite, encefalite e, com menor frequência, pneumonia (42).

1.6.3 Infecção congénita

Como já foi destacado anteriormente, o CMV é o principal agente viral causador de infecção congénita, sendo responsável por casos de mortalidade e morbilidade neonatal (2, 24, 52).

A infecção congénita pode ser adquirida quer durante a infecção primária numa mãe seronegativa para CMV antes da concepção, quer durante uma infecção recorrente (reactivação ou reinfeção) numa mãe seropositiva para CMV. Segundo vários autores, a infecção primária materna apresenta um risco superior de transmissão para o feto e tem um efeito teratogénico mais elevado do que as infecções recorrentes. Este facto pode ser justificado, em parte, pela transmissão de anticorpos maternos para o feto nas mães seropositivas para CMV, embora se evidencie a incapacidade de conferir uma protecção total (24, 114, 157).

No que respeita à infecção primária, um factor muito relevante que condiciona a frequência de transmissão e teratogenicidade é o período de gestação em que a infecção é adquirida. Assim, a probabilidade de transmissão é de cerca de 45% no primeiro e segundo trimestres, aumentando para 79% no terceiro trimestre (49, 123). Pelo contrário, a probabilidade de lesão fetal, traduzida em danos do sistema nervoso central, diminui consoante o aumento da idade gestacional do feto (24, 117, 137).

Segundo Griffiths (54), cerca de 12,7% dos recém-nascidos com infecção congénita por CMV apresentam sinais e sintomas da doença citomegálica à nascença. A doença citomegálica inclui atraso de crescimento intra-uterino, petéquias, icterícia, hepatomegália, esplenomegália, alterações analíticas (trombocitopenia, anemia hemolítica, elevação das transaminases e hiperbilirrubinemia) e alterações neurológicas (microcefalia, calcificações cerebrais, etc) (16, 80, 91, 99). Estas alterações neurológicas podem-se evidenciar de diversas formas, tais como, dificuldade na sucção, sonolência, hipotonia, espasticidade, convulsões podendo, inclusive, apresentar lesões irreversíveis, como atraso neuropsicomotor, perda auditiva uni ou bilateral, diminuição da acuidade visual (24).

Os restantes 87,3% de recém-nascidos infectados por via transplacentária apresentam infecção assintomática à nascença. Cerca de 13,5% destes desenvolvem sequelas tardias permanentes durante os três primeiros anos de vida, sendo as mais frequentes o atraso psicomotor (85, 137) e a surdez neuro-sensorial (40, 41, 54, 73). Porém, as sequelas tardias surgem com mais frequência nos recém-nascidos com infecções por CMV sintomáticas à nascença (40-58%) do que nos recém-nascidos com infecções assintomáticas (31).

1.6.4 Infecção perinatal

A infecção perinatal consiste na infecção adquirida durante o parto, através do contacto com as secreções cervicais maternas durante a passagem pelo canal de parto, ou nas primeiras semanas de vida, frequentemente através da ingestão de leite materno (2, 157). Estas duas formas de transmissão perinatal são responsáveis por cerca de 2 a 10% de infecções das crianças até aos 6 meses de idade (54).

Alguns autores admitem ainda outras formas de transmissão como causas de infecção perinatal, como a transmissão iatrogénica (principalmente através de transfusões de hemoderivados) e transmissão por outros fluidos corporais infectados (especialmente saliva e urina) (107, 155).

A infecção perinatal é, na sua grande maioria, assintomática embora, nalguns casos, possa ocorrer o desenvolvimento de sintomas autolimitados como hepatoesplenomegália, linfadenopatia, alterações hepáticas, anemia, neutropénia, trombocitopénia ou pneumonia. (157).

Ao contrário da infecção congénita, as sequelas neurológicas e a perda de audição não são características da infecção perinatal (43).

O período de incubação da infecção perinatal varia de 30 a 120 dias, sendo de 4 a 12 semanas na infecção adquirida durante o parto e de 4 a 16 semanas na infecção transmitida através do leite materno (157). A excreção viral pela urina do recém-nascido geralmente é bastante prolongada tal como se verifica na infecção congénita (157).

1.6.4.1 Leite materno como veículo de transmissão para infecção citomegálica no recém-nascido prematuro

A partir do início da década de 70, altura em que o CMV foi isolado pela primeira vez no leite materno, o aleitamento natural destacou-se como sendo uma potencial fonte de infecção de CMV no primeiro ano de vida (56, 57, 87, 134).

Em diversos estudos de investigação constatou-se que a grande maioria das puérperas excretoras de CMV no leite materno, para além de não excretarem o vírus pela saliva e urina, nos estudos serológicos mantêm presença de IgG e ausência da Imunoglobulina M (IgM) (25, 61, 92). Estes resultados sugerem a hipótese da reactivação ter lugar na própria glândula mamária, sendo um mecanismo de reactivação local que ainda está por ser esclarecido (92, 106).

A incidência da infecção perinatal através do leite materno não se distribui da mesma forma ao nível mundial, variando consoante a seroprevalência de CMV nas mulheres em idade fértil e os padrões de aleitamento (frequência, duração do aleitamento e tratamento do leite) (138, 157).

Analizando vários estudos, entre 66 a 96% das mães com presença de Imunoglobulina G (IgG) para CMV excretam o vírus no leite materno (25, 57, 75, 150, 159). Apesar de,

nalguns casos, se detectar CMV no colostro, embora com uma carga viral muito reduzida, a excreção viral no leite materno inicia-se, geralmente, a partir da primeira semana pós-parto e atinge um valor máximo entre as 4-8 semanas pós-parto. Posteriormente, a carga viral vai diminuindo até o cessamento da excreção viral, que ocorre por volta da 9^a-12^a semana pós-parto (69, 61, 159).

Segundo Hamprecht (60), o momento de transmissão do CMV ocorre perto do pico máximo de carga viral do leite materno, sendo a primeira urina positiva nos recém-nascidos prematuros detectada a partir do 27º dia até o 108º dia pós-parto. As infecções adquiridas antes de um mês de idade parecem ocorrer nos recém-nascidos mais prematuros e associar-se a casos clínicos mais graves.

Nos estudos mais recentes, a taxa de transmissão de CMV nos recém-nascidos através do leite materno infectado oscila entre os 6-58,6%, havendo uma grande discordância entre vários autores (76). Num trabalho de investigação realizado na Alemanha por Hamprecht (57), a transmissão de CMV ocorreu em 38% dos recém-nascidos, dos quais 48% apresentaram infecções sintomáticas. No entanto, noutro estudo elaborado no Japão por Yasuda (159), apenas 10% dos recém-nascidos foram infectados e nenhum sofreu uma infecção sintomática. Estas divergências podem estar relacionadas, em parte, com as diferentes práticas de aleitamento e com as diferentes formas de tratamento do leite materno.

Entre os factores de risco para a transmissão de CMV através do leite materno encontra-se a presença precoce do vírus no leite (57), carga viral elevada, duração prolongada da excreção viral no leite materno (69), prematuridade e baixo peso do recém-nascido (124).

Sabe-se que a prematuridade e baixo peso do recém-nascido, são variáveis que influenciam em grande escala o risco de aquisição precoce e infecção sintomática pelo CMV, ou seja, quanto menor a idade gestacional e o peso do recém-nascido, maior o risco de transmissão de vírus de forma sintomática (150). Especula-se que este facto possa estar relacionado com uma maior permeabilidade da camada epitelial da boca e tracto gastrointestinal e de um baixo número de anticorpos maternos em circulação (86). Ao contrário dos recém-nascidos de termo, os prematuros têm um sistema imunitário

imaturo e muitos nascem antes da fase de maior transferência via transplacentária das imunoglobulinas protectoras, que ocorre depois da 28ª semana de gestação (18, 23).

Assim, enquanto no recém-nascido de termo a infecção por CMV, adquirida através de leite materno infectado, é geralmente assintomática, no recém-nascido prematuro o risco de infecção sintomática é mais elevado (61, 86).

A infecção sintomática pode manifestar-se como pneumonia (135), hepatite (109), colite (78) e, com menor frequência, linfadenopatia e meningite (4).

A pneumonia é caracterizada por febre, aumento de secreções, tosse, taquipneia, aumento progressivo das necessidades de oxigénio e, por vezes, períodos de apneia. A pneumonia pode ter uma evolução clínica prolongada, havendo ocasionalmente necessidade de suporte ventilatório. A pneumonia causada por CMV é difícil de distinguir de outros tipos de pneumonia atípica no recém-nascido, como a provocada por *Chlamydia trachomatis* ou pelo Vírus Sincicial Respiratório (2).

As manifestações clínicas da hepatite são geralmente ligeiras e autolimitadas, surgindo com frequência hepatomegália ou hepatoesplenomegália, icterícia e aumento moderado das transaminases. O aumento das transaminases atinge o seu pico entre as 2 a 3 semanas após instalação da infecção por CMV, podendo permanecer elevadas durante vários meses. São descritos casos raros de hepatite grave que progridem para hipertensão portal e cirrose hepática (110).

A colite inclui distensão e dor abdominal, vômitos e diarreia líquida. A colite necrotizante e perfuração do íleo são complicações raras associadas à infecção gastrointestinal por CMV em recém-nascidos prematuros (44, 66, 132).

De acordo com um estudo realizado por Hamprecht (57), cerca de 12% dos recém-nascidos prematuros com infecção por CMV desenvolvem um síndrome semelhante a sépsis, caracterizado por palidez, bradicardia e apneia. Estes casos podem ser fatais, pelo que se torna extremamente importante proceder ao diagnóstico diferencial de infecção de origem bacteriana, fúngica ou de outro vírus (107).

As alterações analíticas mais significativas são neutropénia, linfocitose, trombocitopénia, anemia e aumento moderado das transaminases. Estas alterações

desaparecem progressivamente nas primeiras semanas pós-infecção, à excepção da neutropénia que pode ser prolongada. Esta neutropénia persistente, por si só, aumenta a predisposição para as infecções oportunistas nos lactentes prematuros (130).

Quanto às sequelas tardias, tal como foi destacado anteriormente, ao contrário da infecção congénita, não existe associação entre a infecção perinatal e complicações a longo prazo, incluindo alterações no desenvolvimento neurológico e perda de audição neurosensorial, no recém-nascido de termo. No entanto, no que respeita ao recém-nascido prematuro, para além de existir um número de estudos reduzido e destes serem limitados por apresentarem uma amostra pouco representativa, ainda não existe conformidade entre os autores. Vollmer (151), Jim (68) e Miron (92) constataram que a infecção perinatal por CMV não tem efeitos negativos no desenvolvimento neurológico e na audição dos recém-nascidos prematuros. Todavia, Paryani (116) refere que a aquisição precoce da infecção de CMV num recém-nascido prematuro apresenta um maior risco de alterações neurológicas tardias. Para além disso, Bevot (11) refere que os mesmos sujeitos apresentam menores capacidades cognitivas e motoras (por exemplo, expressão verbal, coordenação motora e destreza manual) em comparação com o grupo dos prematuros seronegativos para CMV, encontrando-se, no entanto, ainda dentro dos parâmetros de desenvolvimento cognitivo e motor considerados normais.

1.7 Métodos de diagnóstico

Actualmente existe uma grande diversidade de métodos de diagnóstico disponíveis para a detecção do CMV. No entanto, a escolha do método laboratorial mais adequado deve ser definida consoante as diferentes situações clínicas. Deste modo, o método de diagnóstico difere de acordo com o tipo de contexto em que o indivíduo infectado por CMV se insere, isto é, no grupo dos imunocompetentes, dos imunodeprimidos ou das infecções congénitas.

Em seguida, de uma forma sucinta, procede-se à descrição das técnicas mais utilizadas para o diagnóstico das infecções causadas pelo CMV.

1.7.1 Citologia

Uma das características específicas da infecção por CMV é a chamada célula citomegálica. Esta consiste na alteração de toda a estrutura da célula infectada, provocando um evidente aumento do seu tamanho com uma inclusão intranuclear basófila, originando uma imagem de referência em “olho de mocho” (125). Esta técnica caiu em desuso pela sua baixa sensibilidade, uma vez que o tecido infectado por CMV pode não provocar as alterações morfológicas anteriormente descritas, sendo utilizada quase exclusivamente nos laboratórios de anatomia patológica (34).

1.7.2 Isolamento do vírus por cultura celular

O isolamento do vírus por cultura celular é o método de referência para o diagnóstico de infecção citomegálica por apresentar uma especificidade de 100%. Apesar disto, esta técnica está a cair em desuso, sendo cada vez mais frequente a opção pelas técnicas de biologia molecular, devido às dificuldades técnicas, custos inerentes à manutenção das culturas celulares e inferior sensibilidade com presença de casos de falsos-negativos (35).

Os meios de cultura para a promoção do crescimento do CMV podem ser os fibroblastos de tecidos embrionários humanos ou linhas celulares de pulmão fetal humano, tais como, WI-38, MRC-5 ou IMR-90.

O método clássico ou convencional consiste na identificação por microscopia do efeito citopático do vírus, que se desenvolve muito lentamente, podendo surgir só ao fim de 4 a 6 semanas. No sentido de ultrapassar esta limitação, surgiu uma nova técnica designada por *Shell-vial*, que se baseia na amplificação do vírus em cultura celular, depois de uma centrifugação prolongada a baixa velocidade, com a detecção de antígenos nucleares víricos produzidos no início da replicação e antes do desenvolvimento dos efeitos citopáticos nas células. Assim, em caso de infecção por CMV consegue-se visualizar, através de um microscópio de fluorescência, a coloração dos núcleos ao fim de 24 a 48 horas (65).

1.7.3 Técnica de antigenémia

A técnica de antigenémia consiste na identificação precoce do antígeno viral pp65 no núcleo dos leucócitos de sangue periférico por técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência (1). A antigenémia é uma técnica qualitativa e quantitativa, permitindo a correlação da virémia com o risco de progressão e severidade da doença causada pelo CMV, a monitorização da eficácia da terapêutica e a validação da terapêutica “*preemptive*”. Desta forma, é amplamente usada em doentes imunodeprimidos, incluindo os indivíduos infectados com HIV, e os doentes submetidos a transplantação (46, 141).

A técnica de antigenémia é considerada um método de diagnóstico simples, precoce, relativamente económico e com boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de infecção por CMV. No entanto, a sua especificidade e valor preditivo positivo para o diagnóstico da doença por CMV não é tão alta, havendo indivíduos com infecção assintomática que apresentam muitas vezes antigenémias positivas (156).

A principal desvantagem deste método é a necessidade de processamento laboratorial imediato (14). Devido a este facto, a antigenémia tem vindo a ser substituída pelas técnicas de biologia molecular, com quantificação, já que estas últimas possibilitam o armazenamento e junção de um número significativo de amostras para análise, havendo uma melhoria na rentabilização de tempo e recursos económicos. Para além disso, as técnicas de biologia molecular têm demonstrado maior sensibilidade e uma maior precisão para o diagnóstico de CMV que a técnica de antigenémia (28, 37, 47, 63).

1.7.4 Testes serológicos

Os testes serológicos consistem na detecção dos anticorpos IgM e IgG dirigidos para o CMV, permitindo o diagnóstico da infecção primária por CMV e a avaliação do estado imunitário. A informação do estado imunitário, ou seja, a determinação de contacto prévio com o CMV, é extremamente importante no caso dos doentes submetidos a transplantação e nas mulheres grávidas, para o rastreio dos grupos de risco (99).

O diagnóstico da infecção primária reside na seroconversão do anticorpo IgG para positivo ou na presença do anticorpo IgM. No entanto, a presença deste último funciona como um aviso de uma provável infecção aguda primária, devido à existência de um grande número de falsos positivos, pelo que se deve proceder a técnicas confirmatórias como a técnica de Avidéz das IgGs ou a técnica de Western Blot para as IgM (111, 114).

Actualmente, a técnica confirmatória mais utilizada é a técnica de Avidéz das IgGs, que se baseia na produção de anticorpos com baixa avidéz nas primeiras semanas da infecção primária. Estes anticorpos são facilmente retirados das suas ligações aos antígenos do CMV quando se utiliza o agente desnaturante, a ureia, durante o ensaio imunoenzimático. Assim, na presença de um Índice de Avidéz (IA) elevado, ou seja, superior a 50%, pode-se excluir uma infecção primária recente (53).

1.7.5 Detecção dos ácidos nucleicos virais

Foi com o desenvolvimento da Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) que se despoletou a utilização dos métodos de Biologia Molecular para o estudo e o diagnóstico de infecções por CMV.

A descoberta da PCR, realizada por Kary Mullis no ano de 1983 e tendo sido galardoada com Prémio Nobel da Química 10 anos mais tarde, trouxe enormes benefícios e desenvolvimentos científicos principalmente no estudo de genética molecular e no diagnóstico rápido de doenças infecciosas (82).

A técnica de PCR consiste na amplificação exponencial de uma sequência seleccionada a partir de um fragmento ou molécula de ácido nucleico. Para que a concretização da reacção de PCR seja possível é então necessário um fragmento ou molécula de ácido nucleico que contenha a sequência que se pretende amplificar; *primers* (oligonucleótidos iniciadores da reacção) que sejam homólogos das regiões que flanqueiam a sequência alvo; nucleótidos; e uma enzima que promova a reacção. A enzima, vulgarmente utilizada para este fim, designa-se por Taq Polimerase (isolada a partir de uma bactéria aquática termófila - *Thermus aquaticus*) que apresenta as

características de síntese de ADN no sentido 5' para 3' e a capacidade de resistir às altas temperaturas necessárias para a desnaturação do ADN durante a PCR.

Em cada ciclo de PCR, com base nas diferentes temperaturas, ocorre a separação das cadeias de ADN, emparelhamento dos *primers* ao ADN em cadeia simples e síntese do ADN, que correspondem às diferentes fases de PCR, a desnaturação, hibridação e extensão, respectivamente (figura 5). A reacção de PCR é constituída por sucessivos ciclos, sendo que o ADN sintetizado num ciclo é utilizado como molde para o ciclo seguinte. Cada n ciclos leva à produção de 2^n cadeias de ADN, num processo exponencial, pelo que para dar início a uma reacção de PCR basta, em teoria, apenas a presença de uma molécula do ADN-alvo (149).

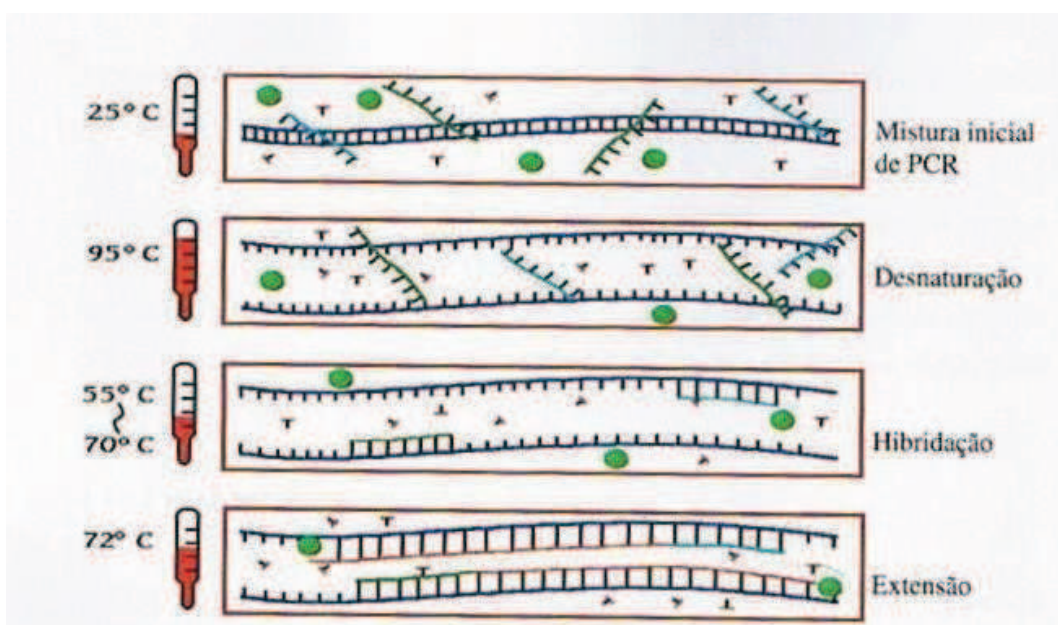


Figura 5 – Diferentes fases da técnica de PCR (adaptado de Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein. 2004. Microbiology. 6th edition. McGraw-Hill Higher Education, EUA).

A amplificação de ácidos nucleicos por PCR ganhou um papel relevante para o diagnóstico de infecção por CMV. Para além de apresentar uma alta sensibilidade e especificidade na detecção da presença do ADN do CMV (45), reúne também boas condições para a sua utilização frequente: a possibilidade de armazenamento a -20°C das amostras clínicas até ao seu processamento e a possibilidade de repetir os testes em

caso de resultados duvidosos, devido à utilização de pequenos volumes de material clínico (90).

A PCR serve de alicerce para diversas variantes que têm sido desenvolvidas nestes últimos anos, quer para trabalhos científicos de investigação, quer para o diagnóstico de rotina. Entre as mais divulgadas, encontram-se a *Nested-PCR* e a Reacção em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR-TR), técnicas que serão utilizadas no presente estudo.

A *Nested-PCR* engloba duas reacções de amplificação de ADN sucessivas com dois pares de *primers* distintos, os externos e os internos, melhorando significativamente a sensibilidade e a especificidade em comparação com a PCR “clássica” ou simples (33, 56). A *Nested-PCR* é apropriada para situações cuja quantificação não é essencial, bastando uma avaliação qualitativa. Por exemplo, a detecção de ADN de CMV no recém-nascido à nascença é suficiente para diagnosticar uma infecção congénita. Para além disso, é amplamente utilizada para situações que exijam uma grande sensibilidade, como no caso de detecção do CMV nas encefalites, onde a baixa carga viral não permite a detecção por outros métodos laboratoriais de uma forma fiável.

A técnica de PCR em Tempo Real representa uma revolução no diagnóstico das infecções por CMV pois permite a detecção qualitativa e quantitativa do ADN viral, possibilitando o seu uso para a avaliação da severidade e risco de complicações adjacentes e para a monitorização da terapia antiviral (33).

Assim, a PCR-TR é determinante para o diagnóstico e monitorização dos doentes imunodeprimidos com risco de infecção por CMV. A utilidade clínica da determinação da carga viral nestes doentes é a possibilidade de determinar quando se deve iniciar a dita terapêutica “*preemptive*”, de monitorizar a duração e eficácia da terapêutica e determinar os doentes que estão em risco de desenvolver uma infecção recorrente por CMV (22, 45, 47).

A PCR-TR tem sido bem reconhecida por apresentar várias vantagens sobre a *Nested-PCR*. Para além de permitir a quantificação da carga viral, reduz o risco de contaminação, sendo realizado num sistema fechado; é uma técnica laboratorial segura, não havendo necessidade de manusear substâncias tóxicas e mutagénicas, tais como o Brometo de Etídeo; e permite uma notável redução do tempo necessário para obter

resultados. Assim, a PCR-TR é um método com boa sensibilidade e especificidade, rápido e quantitativo (33, 47, 142).

Actualmente, existem diversos estudos que comparam estas duas técnicas no sentido de determinar qual é a que apresenta maior sensibilidade, embora os resultados entre os estudos sejam contraditórios, pelo que ainda é uma questão polémica (33, 67, 160).

1.8 Diagnóstico das infecções verticais

O diagnóstico das infecções perinatais por CMV baseia-se no isolamento do vírus ou na detecção do genoma viral nas amostras clínicas. Os testes serológicos, nestes casos, não são úteis pois a detecção dos anticorpos IgG dirigidos para o CMV nos primeiros 9 a 12 meses de idade traduzem, geralmente, transmissão transplacentária dos anticorpos maternos. A detecção dos anticorpos IgM pode ser útil, apesar da sua ausência não descartar uma possível infecção e a sua presença não a confirmar com segurança, devido ao grande número de falsos positivos e negativos (136).

O método de referência para o diagnóstico de infecção congénita no período pós-natal é o isolamento do vírus por cultura celular, geralmente da urina do recém-nascido (105), por existir uma intensa excreção do vírus através do aparelho urinário, e, com menor frequência, da saliva da criança (3). Como foi salientado anteriormente, os resultados do isolamento do vírus por cultura celular através do método convencional pode demorar cerca de 4 a 6 semanas, enquanto pela técnica de *Shell-vials* demora cerca de 24 a 48 horas, pelo que, actualmente, esta tem sido a mais utilizada, embora esteja progressivamente a ser substituída por técnicas de biologia molecular (115).

Os métodos de diagnóstico de biologia molecular baseados na PCR têm demonstrado uma boa sensibilidade para a detecção do CMV para uma variedade de amostras biológicas, como a urina, saliva, soro, sangue, líquido cefalorraquidiano, tecidos para biópsia, leite e lavado broncoalveolar (29, 101, 143, 153).

A PCR quantitativa pode ser útil para identificar os recém-nascidos com uma carga viral mais alta, logo, com maior risco de infecção sintomática e severa, assim como, monitorizar o desenvolvimento da infecção e o efeito do tratamento antiviral (55).

A detecção de CMV na urina dos recém-nascidos nas 3 semanas pós-parto permite fazer o diagnóstico de infecção congénita. Como a excreção viral no recém-nascido infectado é muito prolongada, podendo chegar aos 3 anos de idade, a detecção do vírus após as 3 semanas de idade pode ser consequência, tanto de uma infecção congénita como perinatal (52, 114). Para proceder ao diagnóstico diferencial tardio entre estes dois tipos de infecção pode-se recorrer aos cartões do diagnóstico precoce (*Guthrie Cards* ou “teste do pézinho”), que apresentam sangue seco colhido na primeira semana de idade, e obter resultados através de técnicas de PCR. Segundo alguns autores, esta técnica apresenta 100% de sensibilidade e 99% de especificidade (112, 113, 114). Desta forma, um resultado positivo confirma a infecção congénita, enquanto um negativo confirma a infecção adquirida (6, 7, 8).

Quando o diagnóstico de infecção congénita é rejeitado, a descoberta de uma fonte de transmissão de infecção, como é o caso do leite materno ou das secreções cervicais, ao mesmo tempo de uma urina ou saliva positiva de um recém-nascido, pode sugerir uma infecção perinatal (60).

Segundo Hamprecht (60), os métodos de diagnóstico de referência para a detecção da reactivação viral no leite materno são os de biologia molecular, havendo um aumento de sensibilidade quando o leite materno é sujeito a um processo de separação dos seus componentes antes da extracção de ADN viral (56, 58).

1.9 Tratamento e prevenção das infecções citomegálicas adquiridas através do leite materno

As infecções perinatais, como referido anteriormente, geralmente mantêm-se assintomáticas e, por isso, frequentemente não são diagnosticadas, havendo necessidade de recorrer ao tratamento apenas nos casos de infecção sintomática grave (54). Assim, a evidência da eficácia do tratamento antiviral nas infecções perinatais por CMV ainda é muito limitada e baseia-se principalmente em casos clínicos significativos (108).

Alguns autores relataram melhoria clínica após administração do ganciclovir na infecção perinatal grave, quando manifestada como síndrome séptico ou doença

multissistêmica (55, 89), e nas infecções com sintomatologia como hepatite (89, 110), pneumonia (4), colite (19) e meningite (4). Nestes estudos, os autores referem que a administração do ganciclovir parece ter diminuído a duração da sintomatologia. Em contrapartida, outros referem que, nos seus estudos, os mesmos quadros clínicos resolveram-se espontaneamente, sem necessidade de terapêutica antiviral (32, 57, 78, 86, 92, 100, 150).

O principal inconveniente do ganciclovir intravenoso é a necessidade de um internamento hospitalar prolongado e manutenção de um acesso intravenoso. Desta forma, há um risco de desenvolvimento de infecções nosocomiais, especialmente relacionadas com o cateter venoso. O ganciclovir oral poderia ser uma alternativa mas apresenta uma fraca biodisponibilidade, pelo que seria necessário uma dose muito elevada para conseguir ter níveis terapêuticos aceitáveis (5).

O valganciclovir é um prófarmaco do ganciclovir com uma biodisponibilidade por via oral de aproximadamente de 60%. Este fármaco pode representar uma alternativa ao tratamento das infecções perinatais, facilitando o seu tratamento no ambulatório e diminuindo o risco de infecções nosocomiais. A administração do valganciclovir nos recém-nascidos tem sido bem tolerada e tem demonstrado uma boa capacidade de inibição da replicação viral de forma prolongada, incluindo no recém-nascido de baixo peso (96).

O ganciclovir e o valganciclovir apresentam diversos efeitos adversos, sendo o mais frequente a neutropénia. Por esta razão, é aconselhável um hemograma de controlo periodicamente nos recém-nascidos submetidos a esta terapêutica. Relativamente aos recém-nascidos prematuros, ainda existem poucos estudos que possam proporcionar respostas conclusivas quanto à eficácia da terapêutica antiviral neste grupo (5, 19).

A administração da imunoglobulina intravenosa (IGIV) tem como objectivo reduzir o risco de infecção nos recém-nascidos prematuros e de baixo peso. Actualmente, ainda não existe uma evidência para recomendar a sua utilização na prevenção da infecção perinatal por CMV. Segundo um estudo sobre esta temática, verificou-se uma menor frequência de infecção perinatal nos recém-nascidos com menos de 28 semanas de idade que receberam a IGIV em comparação com os que não fizeram qualquer

terapêutica profiláctica (23). Num estudo idêntico, verificou-se uma baixa percentagem de casos sintomáticos e aumento do número de anticorpos para CMV no grupo a que foi administrada a IGIV (95).

Uma vez que o leite materno é a principal fonte de infecção perinatal no recém-nascido, alguns autores referem que uma forma de prevenir a transmissão de CMV no período pós-natal seria evitar o aleitamento materno. No entanto, este é um assunto muito polémico entre toda a comunidade científica e médica (128). O leite humano, para além das suas propriedades nutritivas, que promovem o crescimento e desenvolvimento da criança, apresenta na sua composição uma complexidade de células e constituintes que têm como principal função a protecção do lactente (77). Assim, as puérperas podem transmitir anticorpos específicos contra o CMV mas, ao mesmo tempo, excretar e transmitir o CMV através do seu leite.

O conceito mais actual é que, nos recém-nascidos de termo, os benefícios do aleitamento materno são muito superiores ao risco de transmissão de CMV e de infecção sintomática. Todavia, este cenário torna-se diferente quando se analisam os casos de puérperas que estejam a excretar CMV pelo leite, cujos recém-nascidos são prematuros (idade gestacional inferior a 37 semanas) e de baixo peso à nascença (peso inferior a 2500g). Nestas situações, vários autores defendem que, por constituírem um grupo de risco para a aquisição de infecção citomegálica, deve-se evitar a administração do leite materno infeccioso.

Por esta razão, têm sido estudados vários métodos de inactivação de CMV no leite materno. O congelamento do leite a uma temperatura de -20°C, durante vários dias, reduz significativamente a sua carga viral, porém, não a elimina por completo. Assim, há uma redução da taxa de transmissão do CMV, mas não assegura a exclusão completa deste risco (87, 124, 129, 159). Para além disso, a administração de leite congelado não parece prevenir os casos sintomáticos e graves de infecção perinatal (20, 32, 68, 78, 109).

O método mais antigo de pasteurização, designado por pasteurização de Holder (63°C durante 30 minutos), elimina o CMV mas também destrói as componentes nutricionais e imunológicas do leite, factores muito importantes para o crescimento saudável das

crianças (12, 79). No entanto, um método de pasteurização descrito mais recentemente parece ser eficiente na eliminação do CMV, perturbando em menor grau as propriedades bioquímicas do leite. Actualmente, este processo é o método de referência para a inactivação do vírus no leite materno, que consiste numa curta pasteurização (72°C durante 10 segundos), mas os meios para este procedimento não estão comercialmente acessíveis (59, 86, 128).

Portanto, o dilema de como tratar o leite das mães seropositivas ainda não está completamente resolvido mas, com o surgimento destas opções para o seu tratamento, a contra-indicação do uso do leite materno é, actualmente, cada vez menos frequente.

Na actualidade, não existe nenhuma vacina aprovada para a prevenção da doença citomegálica, embora estejam em curso ensaios clínicos para o desenvolvimento da mesma (73).

Tendo em conta o estado da investigação aqui delineado, é objectivo do estudo que agora se inicia determinar o número de casos de infecção perinatal por CMV através do leite materno nos recém-nascidos prematuros (com menos de 35 semanas de idade gestacional), admitidos na UCIN do Hospital de São Francisco de Xavier no período de 1 de Outubro de 2010 e 21 de Julho de 2011, e identificar as consequências clínicas daí decorrentes.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 População e amostras

Para a elaboração deste trabalho foram seleccionados, como sujeitos de estudo, todos os recém-nascidos com idade gestacional inferior a 35 semanas e respectivas mães, internados na Unidade de Cuidados Intensivos de Neonatologia (UCIN) do Hospital de São Francisco Xavier pertencente ao Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO), entre o período de 1 de Outubro de 2010 e 31 Julho de 2011. Foram analisadas as urinas dos recém-nascidos e o leite materno das mães na primeira, sexta e décima segunda semana após o parto.

Antes de se proceder à colheita das amostras, procurou-se saber se as mães tinham comprovação do seu estado serológico para CMV durante a gravidez, caso isso não acontecesse, eram realizadas colheitas de sangue para pesquisa de anticorpos IgG para CMV no pós-parto imediato. Todos os pares mãe-bebé cujas mães eram seronegativas para CMV foram excluídos do estudo. Foi também motivo de exclusão, a detecção de infecção congénita traduzida pela virúria positiva na primeira semana pós-parto.

Nos casos em que os recém-nascidos apresentaram virúria positiva na segunda fase de acompanhamento, correspondente à sexta semana pós-parto, suspendeu-se a análise das amostras da décima segunda semana, uma vez que este resultado não iria contribuir para os objectivos do estudo.

Todos os pais dos recém-nascidos que participaram neste estudo assinaram um consentimento informado. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental.

As informações antropométricas e clínicas dos sujeitos em estudo, nomeadamente, a idade gestacional, o tipo de parto, o peso do recém-nascido à nascença, o tempo de internamento dos neonatais, sinais e sintomas passíveis de infecção citomegálica e duração do aleitamento materno, foram fornecidas pela UCIN.

2.2 Pesquisa de IgG para CMV

Como referido anteriormente, para a identificação do par mãe-filho com risco de transmissão de CMV através do leite materno, procedeu-se à pesquisa de IgG maternas para CMV no período pós-natal imediato, à excepção das mães que já tinham conhecimento do seu estado serológico antes de se ter iniciado este estudo. Foi então colhido sangue periférico àquelas mães e realizado transporte destas amostras devidamente acondicionadas para o Laboratório do Hospital da Luz (General-Lab), onde foram posteriormente analisadas. Para tal, foi utilizado o Kit IgG CMV- técnica “*Enzyme Linked Fluorescent Assay*” (ELFA), realizado no equipamento “Vidas” (BioMérieux). Os resultados inferiores ao valor de 4U/mL foram considerados negativos e superiores a 6U/mL foram definidos como positivos.

2.3 Pesquisa de ADN de CMV

2.3.1 Preparação das amostras

As amostras de leite materno e de urina dos pares mãe-filho incluídos no presente estudo, foram devidamente acondicionadas para realização de transporte para o Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Lisboa, onde ficaram posteriormente guardadas numa arca refrigeradora a -70°C.

Antes do leite materno ser armazenado, foi sujeito a um processo de separação dos diferentes componentes, baseado num estudo elaborado por Hamprecht (56), de forma a eliminar as fracções celulares e lípidicas. Este autor verificou que nos leites maternos com baixa carga viral, que não foram sujeitos ao processo de separação, a reacção de amplificação não se concretizava porque a componente lipídica do leite inibia a função da Taq polimerase. Assim, o processamento do leite materno com todos os constituintes presentes diminui a sensibilidade da técnica de PCR para a detecção do ADN viral. Neste mesmo estudo, concluiu-se que o soro do leite, isto é, a componente do leite livre de células e de lípidos, seria a escolha mais acertada para uma eficiente amplificação do ADN viral.

O processo de separação dos componentes utilizados consistiu numa centrifugação a 400 x g durante 10 minutos, à temperatura de 20°C, descartando a camada de gordura

superior. Seguiu-se nova centrifugação a 3200 x g durante 10 minutos, à temperatura de 20°C e, desta vez, foi aproveitada a camada sobrenadante, sendo descartado o sedimento.

2.3.2 Extração de ADN

Para a realização da extração do ADN das amostras clínicas (leite materno e urina) foi utilizado o “*Jetquick Blood and Cell Culture Kit*” (Genomed), conforme as instruções do fabricante relativas ao protocolo “*Purification of DNA from whole blood, serum, plasma or other body fluids*”. Este kit comercial é composto por colunas de eluição, proteinase K, tampões de lavagem (Kx e K2), tampão de lise (K1) e tampão de eluição.

Inicialmente pipetou-se 200 µl da amostra num tubo de 1,5 ml, ao qual se adicionou 20µl de proteinase K, 10 µl de RNase e 200 µl de tampão K1. Esta mistura foi agitada no vórtex e colocada no termobloco a incubar, durante 10 minutos, a 58°C. Desta forma, a proteinase K, para além de digerir as proteínas, actua também sobre as nucleases, diminuindo a degradação do ADN. O tampão de lise, ou seja, o tampão K1, provoca a dissociação do ADN das proteínas nucleares e inibe, de certa forma, a actividade das DNases. A RNase, por sua vez, degrada o ARN.

Após esta incubação, acrescentou-se 200 µl de Etanol Absoluto e agitou-se de imediato para prevenir a precipitação de ADN. Posteriormente, colocou-se esta mistura na coluna *micro-spin*, previamente inserida num tubo colector de 2ml, e centrifugou-se durante um minuto a 10 000 x g à temperatura ambiente (20°C). O ADN é, assim, retido na membrana de sílica-gel, podendo-se rejeitar o líquido filtrado. De seguida, procedeu-se à lavagem da coluna com 500 µl do tampão de lavagem Kx e voltou-se a centrifugar durante um minuto a 10 000 x g a 20°C, com rejeição do líquido filtrado no final desta. Repetiu-se nova lavagem com 500 µl de tampão K2 nas mesmas condições que a anterior. Após estas lavagens, que serviram para aumentar a pureza do ADN, centrifugou-se a coluna vazia durante 1 minuto à velocidade máxima de 13 000 x g a 20°C para secar completamente a sílica.

Colocou-se a coluna num novo tubo de 1,5 ml, adicionou-se 50 µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl; pH 8,5), previamente aquecido a 70°C, deixando actuar durante 2 minutos. Seguidamente, realizou-se uma centrifugação durante 2 minutos a 10 000 x g a 20°C. Estes últimos passos foram repetidos com o objectivo de aumentar a eficácia da eluição e, assim, a concentração de ADN. Após o processo de extracção, as amostras foram guardadas a -20°C até serem amplificadas.

2.3.3 Amplificação de fragmentos de ADN por *Nested*-PCR

Após a extracção do ADN, procedeu-se à amplificação dos fragmentos de ADN de CMV através de uma técnica de reacção da polimerase em cadeia (PCR) com a utilização de dois pares de *primers* distintos em duas séries de reacções de amplificação sucessivas. Nesta técnica, designada por *Nested*-PCR, a segunda PCR amplifica uma sequência-alvo dos produtos de amplificação da primeira reacção de forma a melhorar a especificidade e eficiência da reacção.

Para a realização desta técnica de *Nested*-PCR foi utilizado o protocolo do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas, que foi adaptado a partir de um estudo de Wakefield (152), que tem como objectivo amplificar uma região do gene gp58. A sensibilidade desta técnica foi previamente testada, utilizando uma suspensão da estirpe laboratorial AD-169 com concentração conhecida, na qual se demonstrou que se conseguia detectar o genoma de CMV até uma diluição de 900 cópias/mL (112).

Para a primeira amplificação preparou-se uma mistura de PCR (quantidades utilizadas em cada tubo de PCR) contendo os seguintes reagentes, nas respectivas concentrações:

- 5µl de Tampão de Reacção (200mM Tris-HCL (pH 8,4); 500mM KCl)
- 1, 5 mM de MgCl₂
- 0, 25 µM de cada um dos *primers* externos (gB1 e gB2)
- 200µM de dNTP's
- 1U de Taq ADN Polimerase (Invitrogen)

Tabela 2 – Descrição das sequências oligonucleotídicas dos *primers* externos, utilizados na 1ª reacção de amplificação da *Nested-PCR*.

<i>Primers</i> Externos	Sequências Oligonucleotídicas
gB1	5'- GAG GAC AAC GAA ATC CTG TTG GGC A – 3'
gB2	5'- GTC GAC GGT GGA GAT ACT GCT GAG G – 3'

O volume final da mistura de PCR em cada um dos tubos de reacção foi de 20 µl, ao qual foi adicionado 5 µl de cada extracto. Antes da adição do extracto colocou-se sobre a mistura de PCR uma gota de óleo para prevenir possíveis contaminações.

Esta mistura final foi colocada no termociclador “*Biometra T Gradient 96*” (Alfagene) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação durante dois minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificação compostos de uma desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 55°C durante 30 segundos, extensão a 72°C durante 30 segundos. Após estes ciclos seguiu-se a etapa final de extensão a 72°C, durante cinco minutos.

Após a primeira amplificação, todos os tubos de PCR foram submetidos a uma pequena centrifugação. De seguida, preparou-se uma nova mistura de PCR, com os reagentes e respectivas quantidades:

- 5 µL de Tampão de Reacção (200mM Tris-HCL(pH 8,4); 500mM KCl)
- 1,5 mM de MgCl₂
- 0,5 µM de cada um dos *primers* internos (gB3 e gB4)
- 200 µM de dNTP's
- 1U de Taq ADN Polimerase (Invitrogen)

Tabela 3 – Descrição das sequências oligonucleotídicas dos *primers* internos, utilizados na 2ª reacção de amplificação da *Nested-PCR*.

<i>Primers</i> Internos	Sequências Oligonucleotídicas
gB3	5' - ACC ACC GCA CTG AGG AAT GTC AG – 3'
gB4	5' - TCA ATC ATG CGT TTG AAG AGG TA – 3'

Depois de se ter finalizado a mistura dos reagentes com um volume final de 23 µl para cada tubo de reacção, colocou-se uma gota de óleo, adicionando-se posteriormente 2 µl do produto amplificado na primeira PCR. Esta mistura foi submetida a uma desnaturação durante dois minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de amplificação compostos de uma desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 53°C durante 30 segundos, extensão a 72°C durante 30 segundos. Após estes ciclos seguiu-se a etapa final de extensão a 72°C, durante cinco minutos.

Todas as amostras foram amplificadas em duplicado, ou seja, foram colocadas as mesmas quantidades do ADN extraído da amostra clínica em dois tubos de PCR distintos. Para se verificar a presença de inibidores nas amostras que impedissem a amplificação do ADN, foi ainda testado um controlo interno para cada amostra (para este fim, adicionou-se 2µl de controlo positivo – ver abaixo – à amostra). A ausência de amplificação neste controlo interno, foi interpretada como demonstrativa da presença de inibidores da reacção de PCR.

Em cada sessão de *Nested-PCR* foram ainda incluídos:

- Um controlo positivo (ADN da estirpe-padrão AD 169), para certificar que a reacção de amplificação se processava sem problemas e, ao mesmo tempo, para servir de “marcador do peso molecular” na detecção da amplificação dos fragmentos de ADN;
- Dois controlos negativos (água destilada), para validação de possíveis contaminações.

2.3.4 Detecção dos produtos de amplificação

Após a técnica de *Nested*-PCR os produtos das reacções de amplificação foram separados por electroforese em Gel de Agarose a 1,5% em Tampão TBE 0,5%. Juntou-se num balão de Erlenmeyer 3,75g de Agarose (Eurobio) e 250 ml de Tampão TBE a 0,5%. Estes produtos foram aquecidos até se obter uma solução homogénea e transparente. Deixou-se arrefecer até à temperatura de cerca de 60°C e foram adicionados 6 µl de Brometo de Etídeo (composto que se intercala nas cadeias de ADN). O gel de Agarose foi então colocado no suporte com respectivo pente inserido e deixou-se polimerizar durante 30 a 40 minutos. Colocou-se o suporte com o gel de Agarose na tina de electroforese, onde ficou submerso no tampão de electroforese (Tampão TBE 0,5%). Aos 6 µl de cada amostra amplificada foram adicionados 2µl de corante Blue de T Dye e aplicou-se o volume total no correspondente poço. Os produtos aplicados no gel foram submetidos a um campo eléctrico de 110V, 5 mA, 10W, durante 45 minutos, no aparelho de electroforese “*GNA 200 Submarine Unit*” (Amersham Bioeciences).

A visualização dos produtos de amplificação foi realizada por exposição à luz ultravioleta no transiluminador “STX 26M” (Unitec). Procedeu-se à leitura e interpretação dos resultados, sendo as imagens dos produtos de amplificação da *Nested*-PCR fotografadas com o sistema de fotografia digital “*Kodak EDAS DC290*” (Alfagene).

Considerou-se como resultado negativo, ou seja, ausência do vírus citomegálico na respectiva amostra clínica, sempre que não se verificou amplificação em nenhuma das duas alíquotas, correspondendo assim à ausência de bandas. Confirmou-se a presença de CMV quando se verificou amplificação nas duas alíquotas correspondentes à mesma amostra clínica, observando-se as bandas ao mesmo nível das do controlo positivo. No caso de visualização de uma banda em apenas uma alíquota, repetiu-se todo o processo com nova extracção da amostra.

2.3.5 Técnica de PCR em Tempo Real

Após a determinação do CMV pela técnica de *Nested-PCR*, recorreu-se à técnica de PCR em Tempo Real, com o intuito de confirmar os resultados e determinar a carga viral dos leites maternos.

Para o processamento das amostras pela técnica de PCR em Tempo Real, efectuou-se a extracção de ADN, conforme descrito no ponto 2.3.2.

A técnica de PCR-TR foi efectuada no Sistema de Detecção de Sequências “*ABI Prism 7000 Fast Real Time*” (Applied Biosystems), que consiste num termociclador com um sistema óptico para a excitação da fluorescência e detecção da sua emissão, aliado a um sistema computadorizado com um *software* específico para aquisição e análise final dos dados (figura 6). Deste modo, torna-se possível a monitorização dos produtos de amplificação através da utilização de fluorocromos, que ao emitirem fluorescência, permitem a sua detecção e integração num sistema computadorizado, possibilitando assim a respectiva visualização das reacções de amplificação em tempo real (104).

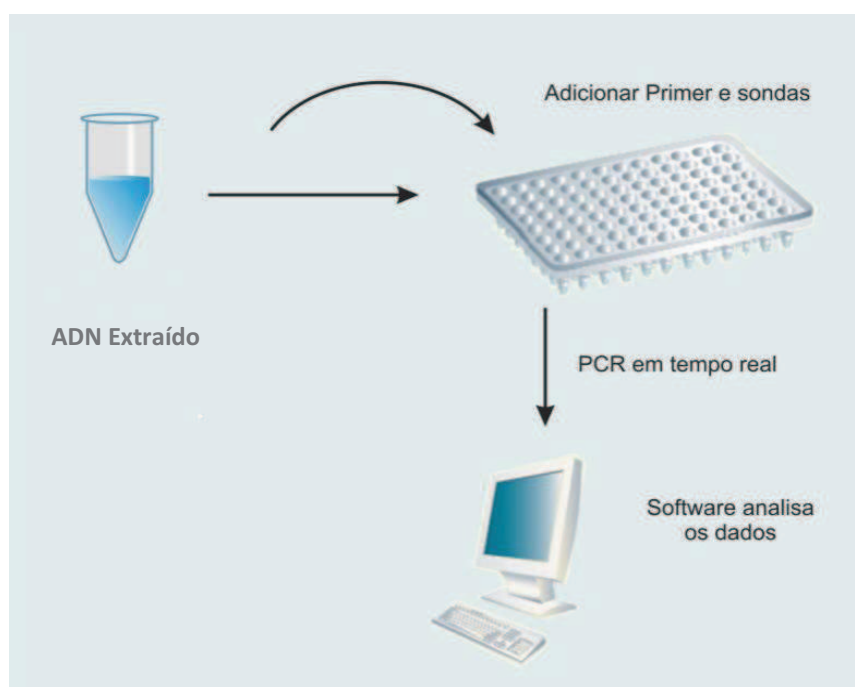


Figura 6 – Esquema do método de PCR em Tempo Real (adaptado de **Weck, Karen.** 2005. Molecular methods of Hepatitis C genotyping. Expert Review of Molecular Diagnosis. 5 (4): 507-520).

A técnica de PCR-TR foi efectuada no Laboratório de Microbiologia do Hospital Egas Moniz, de acordo com o protocolo adoptado pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa.

A sensibilidade desta técnica foi previamente testada por Silva (133), utilizando uma suspensão da estirpe laboratorial AD-169 previamente quantificada, através da qual se determinou que o limite de sensibilidade foi a diluição com a concentração de 200 cópias/mL.

Para o procedimento foram utilizados uma sonda e *primers* específicos (tabela 4) para a região UL83 (283 pares de bases), que codifica a fosfoproteína pp65 do genoma do CMV. A sonda classifica-se como sonda de hidrólise, que é complementar à região interna do produto que se pretende amplificar e apresenta na extremidade 5' um fluorocromo *Reporter* e na extremidade 3' um *Quencher*. Enquanto a sonda se encontrar intacta, a fluorescência emitida pelo *Reporter* é absorvida pelo *Quencher*. Durante a PCR, na fase de hibridação, os *primers* e a sonda hibridizam com a sequência-alvo, sendo que posteriormente, na fase de extensão dos *primers*, a sonda é degradada pela actividade de exonuclease da Taq polimerase. Assim, ocorre a separação do *reporter* e *quencher*, permitindo a detecção da fluorescência emitida pelo *reporter* livre. Durante os sucessivos ciclos de PCR, existe um aumento da fluorescência devido à acumulação progressiva e exponencial de fluorocromos do tipo *reporter* livres (147).

Para além disto, também se encontra na extremidade 3' da sonda uma molécula designada por MGB (*minor groove binding*), que permite o aumento da temperatura de desnaturação da sonda. Esta característica viabiliza a utilização de uma sonda significativamente mais curta, resultando numa maior especificidade para as sequências (50).

Nos ensaios realizados por PCR-TR as concentrações utilizadas em cada mistura de reacção foram as seguintes:

- 1X TaqMan Universal PCR Master Mix
- 7 µMolar de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*)
- 0,3 µMolar de sonda

Tabela 4 – Descrição das sequências oligonucleotídicas dos *primers* e sonda utilizados na PCR em Tempo Real.

	Sequências Oligonucleotídicas
Primer Forward	5' - CCC TCC GGC AAG CTC TTT- 3'
Primer Reverse	5' - CAG GTC CTC TTC CAC GTC AGA- 3'
Sonda	5' - TGC ACG TCA CGC TGG -3'

O volume na mistura de PCR-TR em cada uma das reacções foi de 20µl, aos quais foram adicionados 5µl de cada amostra, perfazendo um volume total de 25µl.

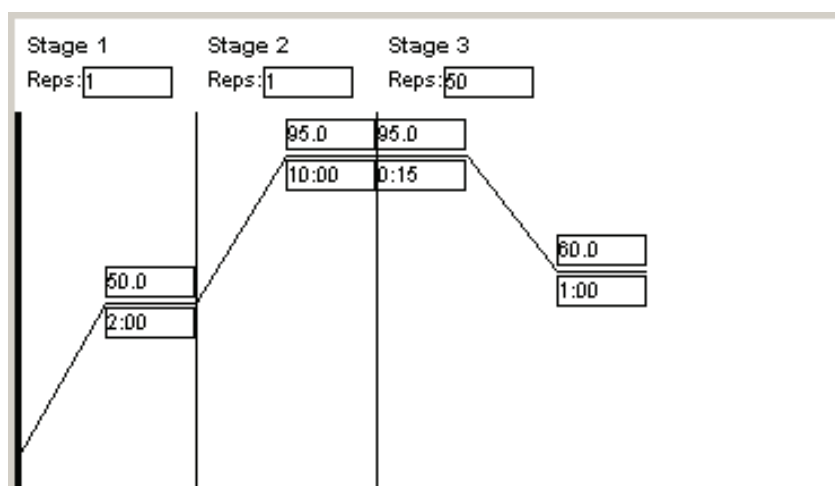


Figura 7 – Ciclos de amplificação da PCR em tempo real.

As condições de amplificação foram representadas na figura anterior: ciclo inicial de 2 minutos a 50°C, seguido de desnaturação inicial a 95°C, durante 10 minutos e, por último, 50 ciclos compostos por desnaturação a 95°C durante 15 segundos e hibridação/extensão a 60°C durante 1 minuto.

Os resultados das amplificações foram analisados informaticamente através do “ABI Prism 7000 SDS Software” – Versão 1.1 (Applied Biosystems).

A PCR-TR permite a determinação da quantidade de produto de PCR a cada ciclo de amplificação através da intensidade de fluorescência medida. A reacção de amplificação de cada amostra divide-se em três fases distintas: exponencial, linear e estacionária (figura 8). Inicialmente apresenta pequenas variações de fluorescência cujo desenvolvimento não é exponencial, encontrando-se na região da linha de base. Um aumento dos valores da fluorescência acima da linha de base indica a detecção de cópias da sequência-alvo. O ciclo no qual a detecção da fluorescência passa de níveis insignificantes a claramente detectável, é denominado ciclo limiar ou *threshold cycle* (C_t). A partir deste ciclo dá-se o início da fase exponencial, caracterizada por uma elevada eficiência da amplificação, onde se acumulam os produtos de reacção que são duplicados (se a eficiência for de 100%) a cada ciclo. Na fase linear, verifica-se uma diminuição do declive da curva de amplificação, resultado do decréscimo de eficiência da amplificação. Por fim, é alcançada a fase estacionária, onde não existem novos produtos de amplificação e o sinal de fluorescência alcança um valor constante.

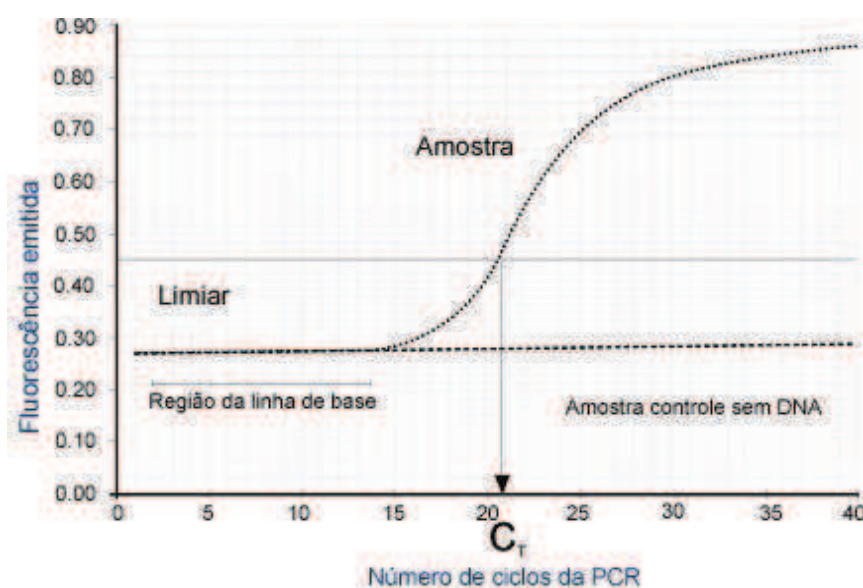


Figura 8 – Curva de amplificação da PCR-TR (adaptado de Novais, Caroline Monteiro, Melissa Pires Alves. 2004. PCR em tempo real. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 33: 10-13).

Neste estudo, de modo a interpretar os resultados de uma forma quantitativa, utilizou-se a quantificação absoluta, ou seja, a quantidade do produto de amplificação baseia-se na comparação da intensidade da fluorescência com uma curva-padrão ou curva de calibração, desenhada a partir de várias diluições com quantidades de ADN viral conhecidas (figura 9).

Para a construção da curva de calibração foi utilizado um extraído da AD169 com uma concentração de ADN de CMV previamente conhecida (351 000 000 cópias/mL). Para tal, em cada sessão de PCR-TR foram realizadas diluições seriadas para a preparação de padrões com concentrações de 351 000, 35 100, 3 510, 351 cópias/mL.

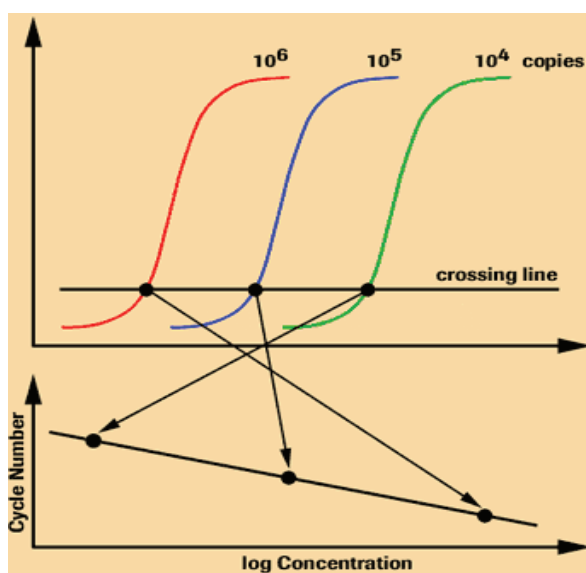


Figura 9 – Construção da curva de calibração. Primeiro gráfico representa reacções de amplificação de diluições seriadas de um extraído com concentração viral conhecida, correlacionando a concentração de ADN (em número de cópias/mL) com o momento em que ocorre um aumento significativo da intensidade de fluorescência (Ct). A partir destes dados constrói-se a curva de calibração, que servirá de base para a quantificação da carga viral das amostras testadas (<http://www.roche-applied-science.com/lightcycler-online>).

Os resultados positivos foram obtidos por extrapolação dos valores de Ct. Desta forma, os valores de Ct determinados para cada amostra são equiparados com os valores de Ct da curva de calibração, fazendo corresponder a um valor aproximado de concentração de ADN de CMV. Os resultados quantitativos finais foram expressos em “cópias/mL”.

Relativamente aos resultados positivos cuja elevação significativa da linha de base observava-se depois do último padrão da curva de calibração, considerou-se o valor da carga viral como sendo < 351 cópias/mL. Uma reacção foi considerada negativa, quando não se verificou qualquer aumento da curva de amplificação para além do limiar de fluorescência (*threshold*). Cada amostra foi processada em duplicado. Sempre que não se verificou amplificação nos dois poços relativos à mesma amostra, repetiu-se todo o processo (incluindo novas extracções).

Como medidas de controlo por sessão de PCR-TR foram utilizados controlos negativos e controlos positivos, que consistiram respectivamente, na substituição dos extraídos por água destilada e de extraídos da estirpe AD-169.

3 - RESULTADOS

3. RESULTADOS

Entre o período de 1 de Outubro de 2010 e 31 de Julho de 2011 foram internados, na UCIN do Hospital de São Francisco Xavier, 84 recém-nascidos (correspondendo a 76 puérperas, entre as quais oito tiveram partos gemelares) com idade gestacional inferior a 35 semanas. Dezoito recém-nascidos foram excluídos do estudo devido ao facto das suas mães serem seronegativas para CMV (ausência de IgG para CMV) (Figura 10). Portanto, do total de 76 puérperas, 18 (24%) eram seronegativas para CMV.



Figura 10- Resultados dos testes serológicos (detecção do anticorpo IgG anti-CMV) nas mães dos recém-nascidos com idade gestacional inferior a 35 semanas que foram internados na UCIN do Hospital de São Francisco de Xavier.

Dos 66 recém-nascidos, foram excluídos mais quatro (dois por ausência de produção de leite materno; um por suspensão de amamentação, visto que a puérpera cumpria terapêutica com efeitos adversos para o lactente; um por óbito neonatal), restando 62 recém-nascidos (inclui oito pares de gémeos) que correspondem a 54 puérperas.

3.1 Resultados da detecção de CMV na urina dos lactentes

Na primeira semana pós-parto, procedeu-se à detecção da presença de CMV na urina dos 62 recém-nascidos através da técnica de *Nested-PCR* (tabela 5). Desta forma, constatou-se que dois (3,2%) recém-nascidos apresentaram virúria positiva para CMV, ou seja, foi-lhes diagnosticado uma infecção citomegálica congénita, pelo que foram automaticamente excluídos do presente estudo, restando 60 recém-nascidos (53 mães). Esta informação foi transmitida ao clínico, o mais precocemente possível, com o intuito de se realizar um acompanhamento devido aos respectivos recém-nascidos.

Tabela 5– Detecção de ADN do CMV nas urinas dos recém-nascidos na 1ª semana de vida, através da técnica de *Nested-PCR*, para exclusão de infecção citomegálica congénita.

Urina	1ª semana n (%)
Negativo	60 (96,8)
Positivo	2 (3,2)
Total de Amostras Analisadas	62 (100)

Observando a tabela 6, constatou-se que na sexta semana pós-parto, não se realizaram 12 (20%) colheitas de urina (dez casos por ausência à consulta de acompanhamento e dois por óbito neonatal).

Relativamente às urinas colhidas dos restantes 48 lactentes, na sexta semana pós-parto verificou-se a presença de ADN de CMV na urina de oito (16,7%) lactentes, que se traduziu no diagnóstico de infecção perinatal. A urina destes lactentes não foi sujeita a mais nenhuma avaliação, ficando 40 lactentes por analisar posteriormente. Na décima segunda semana detectou-se a presença de ADN de CMV na urina de nove lactentes de um total de 34 (em seis casos não houve comparência à consulta de acompanhamento), o que corresponde a 26,5% de infecções perinatais neste período.

Tabela 6 – Detecção de ADN do CMV nas urinas dos lactentes na 6ª e 12ª semana de vida, através da técnica de *Nested-PCR*.

Urina	6ª semana n (%)	12ª semana n (%)
Negativo	40 (83,3)	25 (73,5)
Positivo	8 (16,7)	9 (26,5)
Total de Amostras Analisadas	48 (100)	34 (100)
Sem amostra	12	6

Em suma, ao longo da sexta e décima segunda semana pós-parto ocorreu perda do acompanhamento proposto relativamente ao número inicial (sessenta) dos sujeitos de estudo, por indisponibilidade por parte dos pais em acompanhar o estudo (apesar de consentimento informado assinado) ou óbito neonatal. Desta forma, ficou por determinar o resultado de 18 (30%) lactentes, restando 42 que levaram o estudo até ao final. No conjunto dos resultados obtidos, detectaram-se 17 infecções perinatais, que representam 40,5% (17/42), para um total de 42 lactentes. (Figura 11).

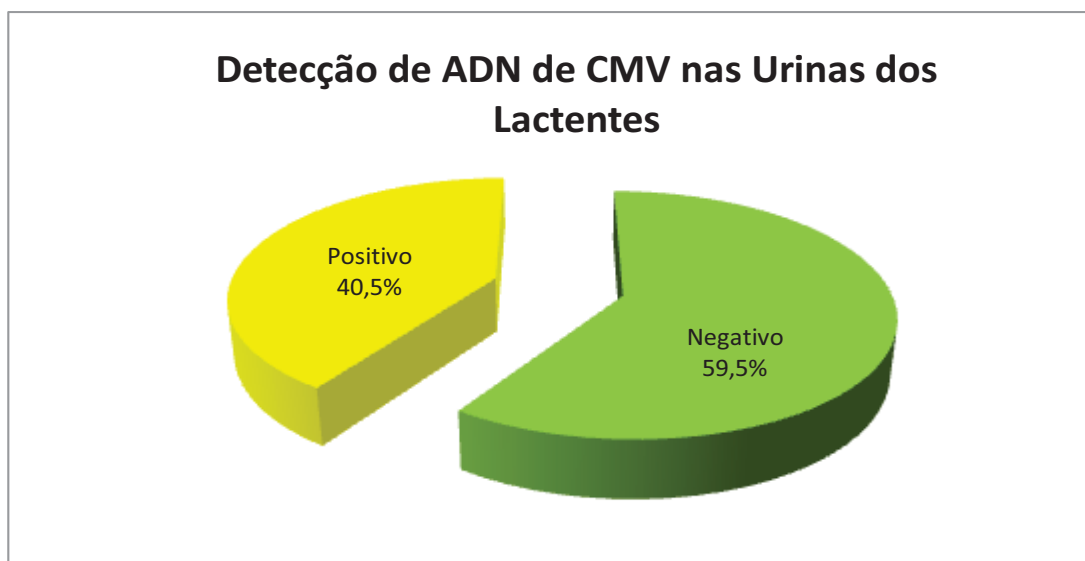


Figura 11 – Detecção do ADN do CMV nas urinas do total de 42 lactentes, através da técnica de *Nested-PCR*.

3.2 Resultados qualitativos da pesquisa de CMV no leite materno

No sentido de perceber se as infecções perinatais detectadas têm origem na transmissão de CMV pelo leite materno, procedeu-se em simultâneo à pesquisa de CMV no mesmo, através da *Nested-PCR*.

Na primeira semana pós-parto foram analisados 53 leites maternos nos quais se detectou ADN de CMV em 18 leites (34%). Na sexta semana, do total de 33 leites maternos analisados, detectou-se ADN de CMV em 23 (69,7%). Na décima segunda semana, do total de 19 leites maternos analisados, detectou-se presença de ADN de CMV em sete (36,8%). Ao longo do estudo, constatou-se uma redução de amostras de leite materno para analisar por falta de participação dos pais ou por ausência de produção de leite materno.

Tabela 7 – Detecção de ADN do CMV nos leites maternos na 1ª, 6ª e 12ª semana pós-parto, através da técnica de *Nested-PCR*.

Leite Materno	1ª semana n (%)	6ª semana n (%)	12ª semana n (%)
Negativo	35 (66,0)	10 (30,3)	12 (63,2)
Positivo	18 (34,0)	23 (69,7)	7 (36,8)
Total de Amostras Analisadas	53 (100)	33 (100)	19 (100)
Sem amostra	0	20	34

Comparando estes resultados, observou-se um aumento do número de leites maternos positivos na sexta semana pós-parto. Este facto confirma-se através da observação da figura seguinte (Figura 12), que reflecte a evolução da excreção do CMV no leite materno de forma individualizada, ou seja, de cada mãe.

Analisando esta figura, constatou-se que na sexta semana 15 leites maternos, anteriormente com resultados negativos, tornaram-se positivos. No entanto, nesta semana detectou-se também dois resultados negativos de mães que anteriormente já tinham excretado CMV.

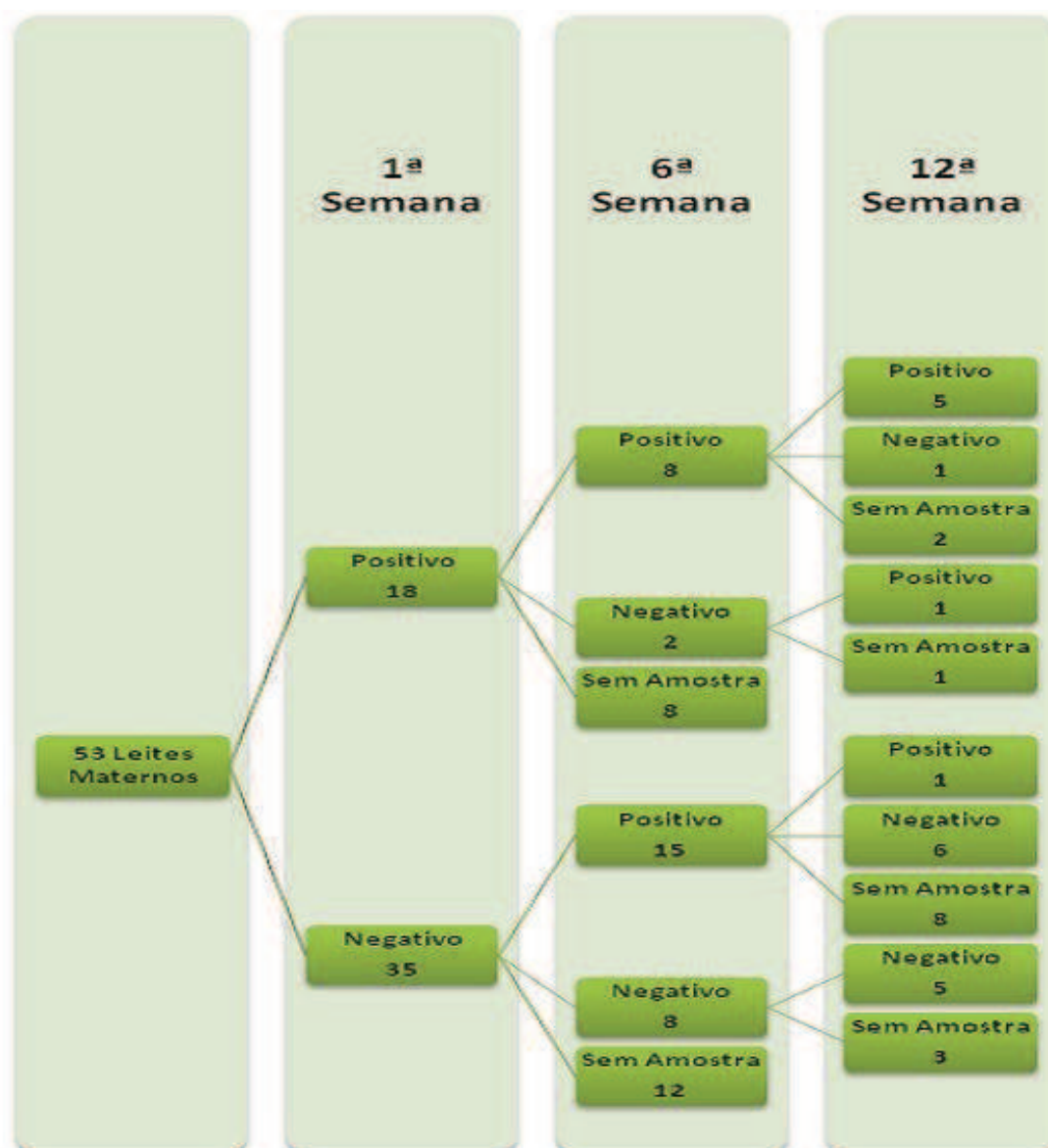


Figura 12 – Evolução de excreção do CMV no leite materno através dos resultados da detecção do ADN de CMV no leite materno pela técnica de diagnóstico *Nested-PCR*.

Na décima segunda semana, verificou-se que apenas um leite materno passou de negativo a positivo (aquele que na primeira semana já tinha tido resultado positivo). Para além disso, constatou-se um decréscimo acentuado de resultados positivos na décima segunda semana, já que sete leites positivos na sexta semana ficaram negativos na décima segunda semana (um dos quais sempre foi positivo desde o início).

Em relação às 37 mães que acompanharam o estudo até ao seu término verificou-se que 27 (72,9%) excretaram CMV através do leite materno ao longo do estudo, sendo que 14 (51,8%) leites maternos foram positivos para CMV logo na primeira semana pós-parto.

3.3 Relação entre os resultados das urinas dos lactentes e do leite materno das respectivas mães

Constatou-se que sete dos oito lactentes, com infecção perinatal detectada na sexta semana, foram alimentados com leite materno com presença de ADN de CMV (três leites com resultado positivo logo na primeira semana). Pode-se presumir que um dos lactentes com infecção perinatal, diagnosticada na sexta semana, não adquiriu esta infecção através da amamentação, visto que o leite da respectiva mãe nunca apresentou resultados positivos na detecção do CMV. Quanto às nove infecções perinatais detectadas na décima segunda semana, verificou-se que todas as mães das crianças infectadas excretaram CMV no leite materno (das quais sete iniciaram sua excreção viral precocemente, sendo detectada a presença de CMV logo na primeira semana pós-parto).

É de salientar que nem todas as crianças alimentadas com leite com presença de ADN de CMV adquiriram, até à data, infecção perinatal, ou seja, nem todas as mães que excretaram CMV através do leite foram transmissoras desta infecção (observou-se 40,7% de mães não transmissoras). Deste modo, procurou-se determinar outros factores que possam estar a influenciar a transmissão do vírus.

3.4 Resultados quantitativos da detecção de CMV no leite materno

Com base em diversos estudos, a presença precoce do CMV, a carga viral elevada e a duração prolongada da excreção viral no leite materno são factores de risco acrescidos para a infecção perinatal de CMV através do aleitamento natural (57, 69, 124). Desta forma, com o intuito de verificar alguma relação entre estes factores e a transmissão da infecção perinatal de CMV através do leite materno nos lactentes do presente estudo, recorreu-se a uma técnica de diagnóstico quantitativa. Assim, através da PCR-TR,

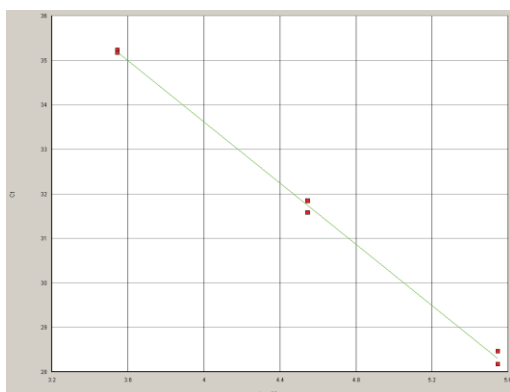
procedeu-se à identificação quantitativa do ADN de CMV nos leites maternos que anteriormente foram identificados como positivos na *Nested-PCR*.

3.4.1 Curvas de calibração e variação intra e inter-ensaios

Para cada sessão de PCR-TR realizou-se uma curva de calibração de forma a permitir uma quantificação absoluta de ADN de CMV. A partir do valor do declive desta curva foi possível determinar a eficiência (E) de amplificação, através da seguinte fórmula:

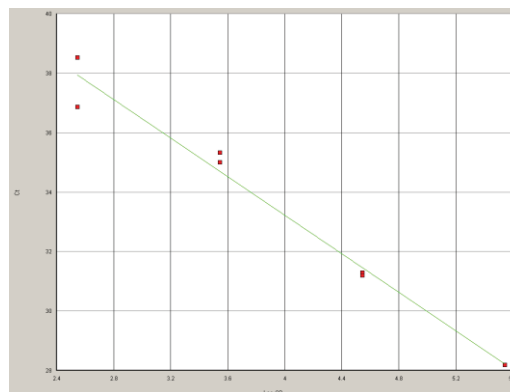
$$E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1$$

A eficiência da reacção de amplificação deve encontrar-se no intervalo de 90-110%, correspondendo a uma slope de -3,1 a -3,6 (119). Assim, determinou-se a eficiência das sessões de PCR-TR efectuadas, encontrando-se dentro do intervalo devido, tal como se pode constatar seguidamente.



Declive: -3,44

Eficiência: 95%



Declive: -3,24

Eficiência: 104%

Figura 13 – Gráficos das curvas de calibração utilizadas na quantificação do CMV e respectivos valores do declive e eficiência.

Para a determinação da variação intra e inter-ensaios utilizou-se três controles de qualidade com cargas virais de CMV diferentes e previamente conhecidas. Cada controlo de qualidade foi amplificado em triplicado em cada sessão de PCR-TR.

Tabela 8 – Valores de desvio-padrão, média e coeficiente de Variação Intra-ensaio de duas sessões de PCR-TR distintas (denominadas como A e B).

Controlo de Qualidade	365018		365020		15130	
Sessão de PCR-TR	A	B	A	B	A	B
Desvio-Padrão (cópias/mL)	142,8	566,2	5 833,9	1 393,9	16 197,0	15 925,7
Concentração Média (cópias/mL)	257,1	803,3	32 185,4	34 158,2	130 534,9	106 485,6
Coeficiente de Variação Intra-ensaio (%)	55,5	70,5	18,1	4,1	12,4	14,9

Através da análise da tabela 8, constatou-se que o coeficiente de variação intra-ensaio nas duas sessões de PCR é elevado (55,5% e 70,5%) quando se testou o controlo de qualidade com carga vírica menor. Nos restantes controlos de qualidade, com concentrações de ADN vírico mais elevadas, verificaram-se menores coeficientes de variação intra-ensaio.

Tabela 9 – Valores do desvio-padrão, média e coeficiente de variação Inter-ensaio (A e B).

Controlo de Qualidade	365018	365020	15130
Desvio-Padrão (cópias/mL)	475,3	3944,4	19490,34
Concentração Média (cópias/mL)	530,2	33171,8	118510,3
Coeficiente de Variação Inter-ensaio (%)	89,6	11,9	16,4

A variação inter-ensaio entre os controlos de qualidade de concentração de ADN mais elevado foi 11,9% e 16,4%, averiguando-se mais uma vez um aumento do coeficiente de variação inter-ensaio no controlo de qualidade com menor carga viral (89,6%).

3.4.2 Evolução da excreção viral no leite materno

Após a detecção dos leites maternos positivos para CMV através da técnica de *Nested-PCR* procedeu-se à quantificação da carga viral dos mesmos.

Como referido anteriormente, com os resultados da *Nested-PCR* verificou-se que, do total de 53 mães, 18 excretaram CMV na primeira semana pós-parto, 23 na sexta semana e sete na décima segunda semana.

Do ponto de vista quantitativo, verifica-se que a média da carga viral dos leites da primeira semana é ligeiramente inferior à da sexta semana (ver tabela 10). No entanto, a média da carga viral do leite na primeira semana é adulterada pelo valor máximo, notando-se uma grande diferença deste valor para o valor seguinte (24 474,76 cópias/mL). Deste modo, através da mediana consegue-se visualizar uma discrepância acentuada entre os valores da carga viral do leite na primeira semana e sexta semana, revelando inclusivamente um pico acentuado nesta última e, posteriormente, um decréscimo considerável da carga viral na décima segunda semana.

Tabela 10 – Média, mediana, mínimos e máximos dos resultados quantitativos do leite materno na primeira, sexta e décima segunda semana pós-parto.

Carga Viral (cópiasADN/mL)	Leite Materno 1ª semana	Leite Materno 6ª semana	Leite Materno 12ª semana
Média	29 656,9	30 784,6	16 861,9
Mediana	4 309,5	17 718,5	1 575,0
Mínimo	< 351,0	< 351,0	< 351,0
Máximo	423 944,2	176 239,9	107 961,3
Número de Amostras Analisadas	18	23	7

3.4.3 Carga viral do leite materno e transmissão de infecção perinatal de CMV

Com o objectivo de verificar se existe uma relação entre a carga viral do leite materno e a transmissão de infecção perinatal de CMV, comparou-se os resultados das urinas dos lactentes que acompanharam o estudo até à décima segunda semana e a carga viral do leite materno (tendo em conta apenas os leites com presença de ADN de CMV) das respectivas mães ao longo das primeiras doze semanas pós-parto. Para a comparação desta variável quantitativa (carga viral), entre os dois grupos de mães transmissoras e não transmissoras de infecção perinatal de CMV, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (144).

Relativamente à primeira semana pós-parto (figura 14), verificou-se que a mediana da carga viral das mães não transmissoras de infecção perinatal de CMV encontra-se na ordem de 616,46 cópias de ADN viral/mL e a das mães transmissoras na ordem de 6181,5 cópias/mL, sendo a mediana da carga viral das mães não transmissoras inferior à das transmissoras.

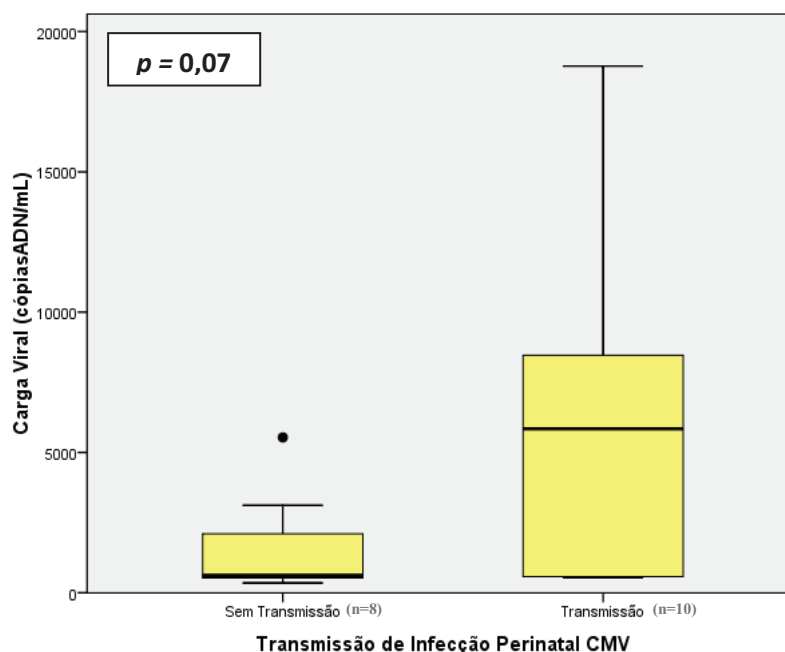


Figura 14 – Relação entre a carga viral do leite materno na 1ª semana pós-parto entre as mães transmissoras e não transmissoras de infecção perinatal de CMV aos respectivos filhos (valor p correspondente ao Teste de Mann-Whitney).

Visto que o número de pares mãe-bebê neste estudo é reduzido, a interpretação do valor p é realizada de acordo com o autor Bland (13) (ver anexo 1). Assim, estatisticamente existe uma fraca evidência de uma diferença da carga viral do leite materno entre os dois grupos de mães ($0,05 < p < 0,1$), na primeira semana pós-parto. Para além disso, a mediana da carga viral das mães que não transmitiram a infecção está muito próxima do valor mínimo (351 cópias/mL), o que não se constatou no grupo das mães transmissoras.

Neste último grupo existe uma maior amplitude dos dados da carga viral, sendo o valor mínimo de 351 cópias/mL e o valor máximo de 18 785,3 cópias/mL. No caso das mães não transmissoras, através da figura 5, consegue-se reconhecer um *outlier* moderado (que corresponde a 5 535,95 cópias/mL), representado com um ponto. De acordo com Moroco (94) e Pestana (118), define-se *outlier* superior moderado como um valor discordante num conjunto de dados, sendo pelo menos, um valor 1,5 vezes superior ao 3º quartil. Assim considerou-se, nesta amostra, que o valor máximo de carga viral do leite das mães não transmissoras é de 3115 cópias/mL.

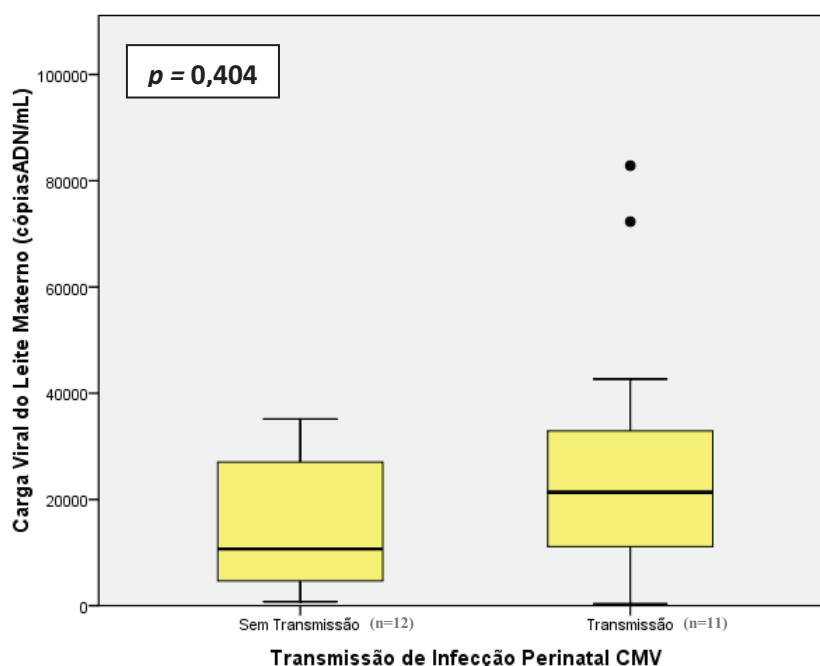


Figura 15 – Relação entre a carga viral do leite materno na 6ª semana pós-parto entre as mães transmissoras e não transmissoras de infecção perinatal de CMV aos respectivos filhos (valor p correspondente ao Teste de Mann-Whitney).

Quanto à sexta semana pós-parto (figura 15), verificou-se a existência de dois *outliers* severos no grupo das mães não transmissoras (o mais alto com uma carga viral de 176 239,9 cópias/mL e o seguinte com o valor de 100 858,41 cópias/mL).

Segundo Moroco (94) e Pestana (118), os *outliers* superiores severos correspondem a valores, no mínimo, três vezes superiores ao 3º quartil. Estes *outliers* severos não estão visíveis na seguinte figura porque obrigaria a utilização de uma escala muito superior, não permitindo uma percepção eficiente dos restantes valores. Em relação ao grupo das mães transmissoras de CMV, constatou-se a existência de dois *outliers* moderados com os valores de 82 842,59 e 72 312,11 cópias/mL (representados na figura por pontos).

Através da visualização da figura 15, constatou-se também que a carga viral dos leites das mães que não transmitem CMV apresenta, mais uma vez, uma mediana inferior à das mães que transmitem, sendo respectivamente 10 682,6 e 21 358 cópias/mL. No entanto, através do teste de Mann-Whitney e de acordo com Bland (13), verificou-se que, na sexta semana pós-parto, os dois grupos de mães apresentam pouca ou nenhuma diferença estatisticamente significativa no que respeita à mediana da carga viral dos leites maternos ($p > 0,1$).

No grupo das mães que não transmitiram CMV verificou-se que 50% dos valores da carga viral do leite encontram-se aproximadamente entre as 5 000 e as 27 000 cópias/mL. O valor mínimo e máximo deste grupo foi respectivamente 739,9 e 35 165,3 cópias/mL. No grupo das mães que transmitiram CMV constatou-se que 50% dos valores da carga viral do leite encontram-se aproximadamente entre as 11 000 e as 33 000 cópias/mL. O valor mínimo e máximo deste grupo foi respectivamente 351 e 42 665,3 cópias/mL.

Na décima segunda semana pós-parto (figura 16), a carga viral dos leites das mães não transmissoras de CMV variou entre 351 a 1575 cópias/mL, apresentando metade dos valores entre o intervalo aproximado de 400 a 1100 cópias/mL.

No grupo das mães transmissoras, o valor mínimo (675,8 cópias/mL) observado é superior à mediana das mães que não transmitem CMV. O valor máximo correspondeu a 4 011,54 cópias/mL, sendo detectado um *outlier* severo de 107 961,3 cópias/mL (não contemplado na figura 7 pela mesma razão anterior).

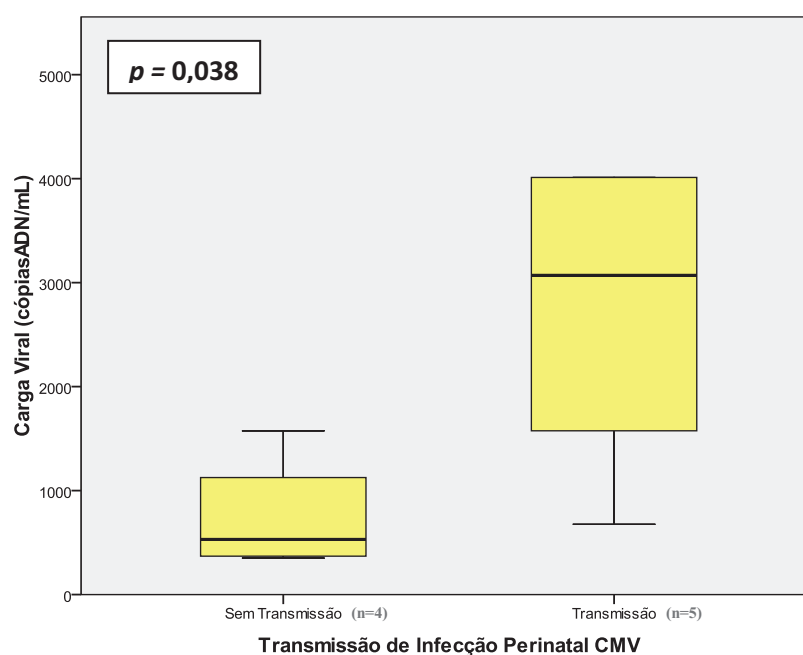


Figura 16 – Relação entre a carga viral do leite materno na 12^a semana pós-parto entre as mães transmissoras e não transmissoras de infecção perinatal de CMV aos respectivos filhos (valor p correspondente ao Teste de Mann-Whitney).

Constatou-se que a mediana da carga viral das mães não transmissoras de CMV (531,7 cópias/mL) é inferior à da carga viral dos leites das mães transmissoras (3 541,5 cópias/mL). Estatisticamente há uma evidência de uma diferença entre as medianas da carga viral do grupo das mães transmissoras e não transmissoras ($0,01 < p < 0,05$), na décima segunda semana.

Através do gráfico seguinte (figura 17), obteve-se uma visão geral da evolução das medianas da carga viral no grupo das mães transmissoras e não transmissoras ao longo do estudo.

Deste modo, constatou-se que os resultados quantitativos obtidos no grupo das mães transmissoras foi sempre superior aos obtidos pelas mães não transmissoras. Salienta-se ainda um crescimento significativo da carga viral excretada no leite materno desde a primeira semana até à sexta semana, e consequente decréscimo até à décima segunda semana pós-parto, nos dois grupos de mães.

Portanto, a análise destes dados permite verificar que a dinâmica de reactivação do CMV através do leite materno é semelhante em todas as mães, quer sejam transmissoras ou não da infecção, com a excepção do facto de nas mães transmissoras a mediana da carga viral manteve-se em todos os períodos mais elevada que nas mães não transmissoras.

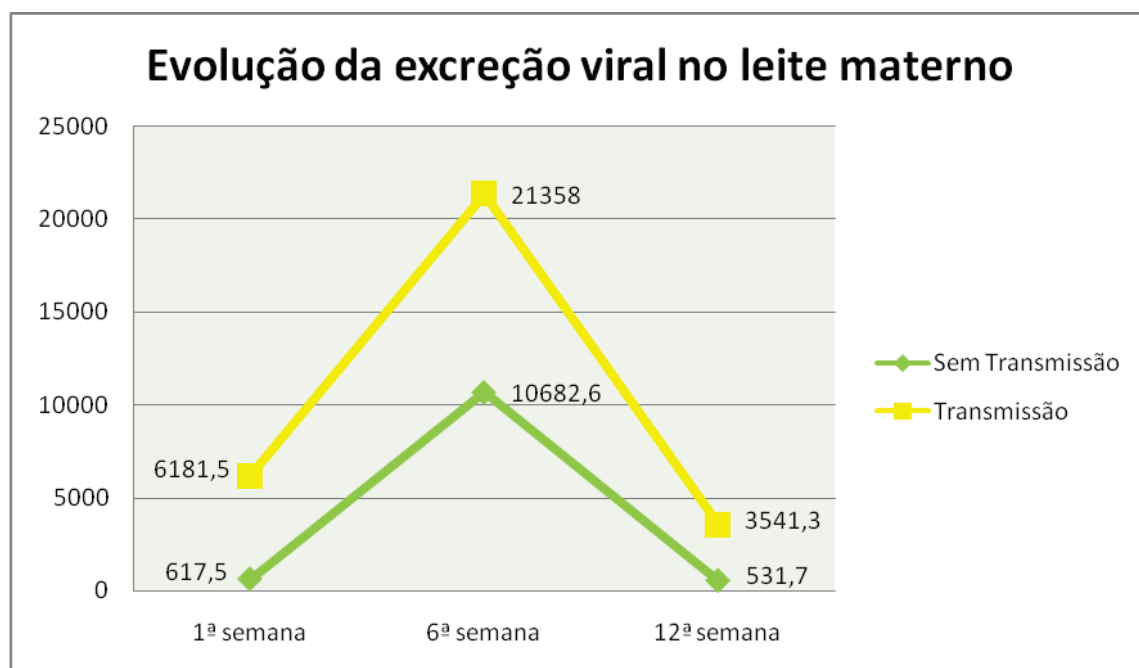


Figura 17 - Comparação da excreção de CMV no leite materno entre as mães transmissoras e não transmissoras, ao longo do estudo.

3.5 Caracterização do grupo de lactentes infectados e não infectados com CMV

Analizando individualmente o grupo dos lactentes com infecção perinatal por CMV e o grupo dos lactentes sem infecção pode-se averiguar que, quanto às características antropométricas, são idênticos (Tabela 11). No que respeita ao tempo de internamento, a média deste item nos lactentes sem infecção perinatal é superior relativamente à do grupo dos lactentes com infecção perinatal devido a um caso de internamento longo de 177 dias, verificando-se que a mediana entre os dois grupos não varia muito entre si.

Através do teste não paramétrico de Mann-Whitney confirmou-se que, estatisticamente, existe pouca ou nenhuma evidência de uma diferença entre o grupo de lactentes com e sem infecção perinatal, sendo o valor p superior a 0,1.

Tabela 11 – Características antropométricas e tempo de internamento na UCIN dos lactentes com e sem infecção perinatal.

	Lactentes Sem Infecção Perinatal (N=25)			Lactentes com Infecção Perinatal (N=17)		
	Média	Mediana	Mín./Máx.	Média	Mediana	Mín./Máx.
Idade Gestacional* (semanas)	30,6	32,0	[25-34]	31,2	31,0	[25-34]
Peso (g)**	1628,2	1616,0	[580-3195]	1508,8	1450,0	[628-2260]
Tempo de Internamento*** (dias)	36.25	17.5	[4-177]	24,12	18,0	[6-105]

* $p=0,764$; ** $p=0,805$; *** $p=0,924$ (Teste de Mann-Whitney)

Como salientado no capítulo 1, existem várias formas de transmissão do CMV, entre as quais, através do contacto com as secreções cervicais durante a passagem do canal de parto e através da transfusão de hemoderivados. Desta forma, é importante ter conhecimento do tipo de parto dos lactentes e se estes foram sujeitos a transfusões sanguíneas durante o seu internamento na UCIN, uma vez que estes factores podem influenciar os resultados do presente estudo.

Tabela 12 – Factores de risco para transmissão de infecção por CMV.

	Lactentes sem Infecção Perinatal (N=25)	Lactentes com Infecção Perinatal (N=17)	Total dos Lactentes (N=43)
Parto Normal*	6 (24%)	4 (23,5%)	10 (23,3%)
Transfusão de Sangue**	9 (36%)	2 (11,8%)	11 (25,6%)

* $p=1$; ** $p=0,085$ (Teste Exacto de Fisher)

Observando a tabela 12, constatou-se que 23,3% do total dos sujeitos de estudo nasceram de parto normal (definido como parto em que ocorra passagem do recém-nascido pelo canal cervical, incluindo, por isso, todos os partos eutócicos e partos distócicos com auxílio de fórceps ou ventosas). Através da análise da mesma tabela pode-se também observar que estes recém-nascidos estão distribuídos de forma idêntica nos dois grupos, mais concretamente, 24% dos lactentes sem infecção perinatal e 23,5% dos lactentes com infecção perinatal tiveram parto normal. Assim, a diferença de percentagem dos partos entre os dois grupos de lactentes não foi significativa, sugerindo que a transmissão através das secreções vaginais não teve um papel significativo na transmissão.

Outro factor importante, para a caracterização dos sujeitos do estudo, consiste em saber se os lactentes foram submetidos a transfusões sanguíneas pois estes podem adquirir infecção por CMV através desta fonte de transmissão. Desta forma, dos 42 lactentes onze (25,6%) receberam pelo menos uma transfusão sanguínea, dos quais houve uma maior percentagem no grupo sem infecção (36%) do que no grupo com infecção por CMV (11,8%).

Com o objectivo de confirmar, estatisticamente, se existiriam diferenças significativas entre o grupo dos lactentes com e sem infecção perinatal por CMV em relação ao tipo de parto e administração de transfusão de sangue, foi aplicado o teste estatístico de Fisher. Desta forma, pode-se concluir que, estatisticamente, não existem diferenças

significativas nos dois grupos de lactentes quanto às variáveis descritas anteriormente, visto que, o nível de significância é superior a 5%.

Um dos critérios de inclusão para os sujeitos do presente estudo era o facto de serem prematuros (IG < 35 semanas), constituindo por si só um factor de risco para aquisição de infecção perinatal por CMV. Com base na literatura científica, sabe-se que a idade gestacional é inversamente proporcional ao risco de transmissão de infecção perinatal, ou seja, quanto menor a IG maior o risco de infecção. Alguns autores (18) acrescentam ainda que, pelo facto de ocorrer uma transferência de anticorpos maternos via transplacentária depois da 28^a semana de gestação, os extremos prematuros (IG < 28 semanas) estão mais susceptíveis à infecção perinatal.

Após a elaboração da tabela 13, constatou-se que apenas 20% (dois) dos extremos prematuros adquiriram infecção perinatal por CMV, enquanto cerca de 47% (quinze) dos prematuros com mais de 28 semanas de gestação adquiriram a mesma.

Tabela 13 – Relação entre a infecção perinatal de CMV e a idade gestacional (IG) dos lactentes.

IG (semanas)	Sem Infecção	Infecção Perinatal Leite CMV+	Infecção Perinatal Leite CMV-	Total
≤ 28	8	1	1	10
>28	17	15	0	32
Total	25	16	1	42

$p = 0,162$ (Teste Exacto de Fisher)

Com o objectivo de determinar se existiriam diferenças significativas entre o grupo dos lactentes com e sem infecção perinatal por CMV, quando divididos consoante a idade gestacional inferior a 28 semanas, foi aplicado o teste estatístico de Fisher. Desta forma, averiguou-se que o valor p era superior a 0,1, ou seja, estatisticamente existe pouca ou nenhuma evidência de uma diferença entre os dois grupos de lactentes, no que respeita à idade gestacional inferior a 28 semanas. Portanto, estatisticamente a idade gestacional

do recém-nascido à nascença não parece influenciar a aquisição de infecção perinatal por CMV na amostra populacional em estudo.

Outro factor de risco para a aquisição da infecção perinatal por CMV nos lactentes é o muito baixo peso à nascença, ou seja, todo o recém-nascido com peso inferior ou igual a 1500g (10). Vários autores referem que os recém-nascidos com peso inferior a 1500g à nascença estão mais susceptíveis de obterem infecção perinatal por CMV (57, 86, 150).

Tabela 14 – Relação entre a infecção perinatal de CMV e o peso à nascença dos lactentes.

Peso (g)	Sem Infecção	Infecção Perinatal Leite CMV+	Infecção Perinatal Leite CMV-	Total
≤1500	11	9	1	21
>1500	14	7	0	21
Total	25	16	1	42

$p=0,530$ (Teste Exacto de Fisher)

Observando a tabela anterior, verificou-se que o número de recém-nascidos infectados com CMV é ligeiramente superior no grupo dos recém-nascidos com peso inferior e igual a 1500g à nascença, em comparação com o grupo com peso superior a 1500g. No entanto, através do teste Exacto de Fisher, constatou-se que o nível de significância entre os dois grupos é superior a 10%, logo, estatisticamente o peso inferior ou igual a 1500g é um factor que não contribui para a aquisição da infecção perinatal de CMV nesta amostragem.

A duração da amamentação pode também influenciar a transmissão de infecção de CMV, visto que os lactentes que ingerem leite materno com presença de CMV durante um período mais longo têm maior risco de serem infectados dos que ingerem durante pouco tempo leite materno contaminado (138, 157). Desta forma, elaborou-se uma tabela que relaciona a duração do aleitamento materno e a transmissão de infecção perinatal de CMV nos 31 lactentes que ingeriram leite com presença de CMV.

Através da análise da tabela 15, constatou-se que dos quatro lactentes que foram amamentados apenas até à primeira semana de idade com leite materno com presença de vírus, apenas um (25%) dos lactentes não foi infectado com o vírus de CMV. Do total de sete lactentes, que ingeriram leite materno com presença de CMV até à sexta semana, dois (28,6%) foram infectados com CMV enquanto que, do total 20 lactentes que beberam leite materno com presença de CMV até à décima segunda semana, onze (55%) adquiriram infecção por CMV. Apesar de se verificar um maior número de lactentes infectados no grupo dos que mantiveram a ingestão de leite materno até pelo menos às 12 semanas (11/16), 3 destes lactentes já se encontravam infectados com CMV na sexta semana pós-parto.

Tabela 15 – Relação entre a infecção perinatal de CMV e a duração do aleitamento materno, nos casos em que ocorre excreção viral.

Duração do aleitamento materno	Sem Infecção	Infecção Perinatal	Total
Até 1 semana	1	3	4
Até 6 semanas	5	2	7
Até 12 semanas	9	11	20
Total	15	16	31

$p = 0,379$ (Teste Exacto de Fisher)

Segundo o Teste Exacto de Fisher, estatisticamente existe pouca ou nenhuma evidência de uma relação entre a duração do aleitamento com leite materno infectado com CMV e a aquisição de infecção perinatal citomegálica nesta amostragem, visto que o valor p foi superior a 0,1.

3.6 Manifestações Clínicas

A única manifestação clínica/laboratorial descrita nos lactentes com infecção perinatal por CMV foi uma alteração laboratorial, nomeadamente, a neutropénia (contagem de neutrófilos com valor inferior a $1500/\text{mm}^3$).

De dezassete lactentes, com diagnóstico de infecção citomegálica, sete (41,2%) apresentaram neutropénia, número este que inclui o lactente que nunca ingeriu leite materno com presença de CMV. Portanto, contando apenas com os lactentes com infecção perinatal que ingeriram leite com presença de CMV, seis (37,5%) apresentaram neutropénia do total de dezasseis lactentes. No entanto, esta alteração laboratorial também foi descrita em seis (24%) lactentes sem infecção perinatal.

Tabela 16 – Relação entre a infecção perinatal de CMV e a neutropénia, nos casos em que ocorre excreção viral.

	Sem Infecção	Infecção Perinatal Leite CMV+	Infecção Perinatal Leite CMV-	Total
Sem Neutropénia	19	10	0	29
Neutropénia	6	6	1	13
Total	25	16	1	42

*($p=0,208$, através do Teste Exacto de Fisher)

Com base no Teste Exacto de Fisher, constatou-se que estatisticamente existe pouca ou nenhuma evidência de uma associação significativa entre a infecção perinatal e a presença de neutropénia nesta amostra populacional, uma vez que o nível de significância foi superior a 0,1.

A neutropénia observada nos dois grupos de lactentes desapareceu espontaneamente, sem necessidade de recurso a terapia antiviral.

4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo visou determinar a prevalência da infecção perinatal citomegálica, transmitida através do aleitamento materno a recém-nascidos prematuros, e identificar as suas consequências clínicas.

O nascimento de um recém-nascido prematuro obriga, por norma, ao seu internamento numa Unidade de Cuidados Intensivos de Neonatologia, de forma a permitir a vigilância do seu estado clínico e assegurar a sua sobrevivência. Desta forma, para a realização deste estudo foi seleccionada a Unidade de Cuidados Intensivos de Neonatologia do Hospital S. Francisco Xavier. Com base no relatório anual da UCIN, constatou-se que os critérios iniciais para a selecção da amostra populacional (prematuros de idade gestacional inferior a 32 semanas e/ou de peso ao nascer inferior a 1500g) reduziam demasiado o número de recém-nascidos aptos para o estudo. Assim, foi necessário alterar os critérios de inclusão dos sujeitos de estudo, passando a aceitar todos os recém-nascidos com idade inferior a 35 semanas completas de idade gestacional, independentemente do seu peso à nascença. No entanto, a amostra populacional foi reduzida devido, em parte, ao incumprimento dos pais em acompanhar o estudo até ao seu término e, por outro lado, à diminuição da taxa de internamento dos recém-nascidos prematuros no período em que decorreu o estudo.

Inicialmente determinou-se o estado serológico em 76 puérperas cujos recém-nascidos, com idade gestacional inferior a 35 semanas, foram internados na UCIN (figura 10). Os anticorpos IgG específicos para CMV foram detectados em 75% das puérperas, o que indicia uma elevada seroprevalência para o CMV. Estes resultados estão em consonância com estudos epidemiológicos que revelam que, em Portugal, a taxa de prevalência de CMV nas mulheres em idade reprodutiva é alta, sendo de 75,5% nas mulheres com idade compreendida entre os 20-29 anos e de 81,5% nas mulheres com idade entre os 30-44 anos (83).

A pesquisa de ADN do CMV nas urinas dos recém-nascidos, na primeira semana de vida, permitiu o estabelecimento do diagnóstico de infecção citomegálica congénita.

Assim, através da técnica de *Nested-PCR*, detectaram-se duas infecções congénitas em 62 recém-nascidos, correspondendo a 3,2% (tabela 5). Segundo Paixão (114), a prevalência da infecção congénita por CMV em Portugal é de 1,05%, sendo esta taxa inferior aos resultados obtidos neste estudo. É de notar que, para além do número da amostra populacional ser muito reduzido para extrapolar os resultados ao nível nacional, também estes resultados baseiam-se apenas nos recém-nascidos com, pelo menos, um factor de risco, a prematuridade.

Ao longo do estudo foram detectadas 17 infecções perinatais por CMV, representando 40,5% do total de 42 lactentes (figura 11). É de salientar que inicialmente foram incluídos neste estudo 60 sujeitos, no entanto, não se conseguiu determinar a transmissão da infecção perinatal em 18 (30%) lactentes pelo facto destes não terem comparecido à consulta de acompanhamento na décima segunda semana pós-parto. Desta forma, a amostra populacional deste estudo foi reduzida para 42 lactentes, visto que apenas este número de sujeitos cumpriram o estudo até ao seu término. Assim, o verdadeiro número de lactentes infectados poderá ser significativamente superior ao detectado. De referir ainda que apenas 16 destas infecções perinatais (38,1%) podem ter tido origem na transmissão através do leite materno, uma vez que um dos lactentes nunca ingeriu leite com presença de CMV.

Como referido anteriormente, existe uma grande controvérsia relativamente às taxas de prevalência de infecção perinatal através do aleitamento materno nos recém-nascidos prematuros. Esta temática foi analisada por diversos grupos de investigação de diferentes países, verificando-se uma variação entre os 6% (32, 92) e os 58,6% (57, 150) na taxa de transmissão através do leite materno. No entanto, existe um consenso entre a maioria dos autores, que consiste na atribuição do leite materno infectado como o principal veículo transmissor de infecção perinatal (23, 57, 86, 100, 134, 150).

Os resultados deste estudo permitem identificar a prevalência da infecção perinatal na amostra populacional, contudo, não conferem com exactidão a origem desta infecção. Uma das formas de confirmar se a infecção perinatal foi ou não transmitida, através do leite materno, seria o recurso a técnicas de sequenciação (23): se não existissem diferenças entre as sequências de ADN viral da urina do lactente e do leite da respectiva mãe, poder-se-ia concluir que a transmissão teria sido através do leite materno. Devido

à escassez de tempo, não foi possível realizar este procedimento, embora o mesmo esteja agendado para breve.

O presente trabalho permite concluir que o início da excreção viral no leite materno, nas mães seropositivas para CMV, pode ocorrer muito precocemente, visto que se detectou a presença de ADN de CMV no leite materno em 34% das 53 puérperas, na primeira semana pós-parto (Tabela 7). Do ponto de vista quantitativo, constatou-se que a carga viral dos leites positivos apresentava uma grande variabilidade, podendo apresentar valores inferiores a 351 cópias/mL até às 423 944,2 cópias/mL (tabela 10). Comparando as cargas virais nas diferentes semanas, observou-se um aumento significativo da mediana das cargas virais da primeira para a sexta semana, seguida de uma redução acentuada na décima segunda semana pós-parto. Nesta última semana, verificou-se que a mediana das cargas virais é ainda mais reduzida que na primeira semana pós-parto. Estes resultados estão em conformidade com estudos prévios que detectaram que a excreção viral no leite pode começar logo na primeira semana pós-parto, tendo sido referenciado, em alguns casos, a presença de CMV no colostro, embora com menor incidência e, geralmente, com uma carga viral baixa. Acrescentam, ainda, que a carga viral atinge um valor máximo entre as 4-8 semanas, seguindo-se uma diminuição até ao completo cessamento da excreção viral por volta da 9^a-12^a semana pós-parto (61, 69, 159), factos que estão em consonância com os resultados deste estudo.

Na análise individual da excreção viral no leite materno (figura 12), constatou-se que, na sexta semana, surge um maior número de conversão de leites negativos para positivos (15 leites), em contraste com a décima segunda semana, altura em que ocorre maior passagem de leites positivos para negativos (7 leites). Nesta avaliação quantitativa surge um caso inesperado de uma mãe com leite positivo na primeira semana, negativo na sexta semana e, novamente, positivo na décima segunda semana. Inicialmente, foi colocada a hipótese de se estar perante resultados falsamente positivos ou negativos, pelo que se repetiu a *Nested*-PCR com novas extracções, obtendo-se, no entanto, os mesmos resultados. Em acréscimo e para excluir a presença de substâncias inibitórias, realizou-se também a *Nested*-PCR com o leite materno da sexta semana numa diluição de 1:5 e, simultaneamente, de 1:10, mas o resultado manteve-se negativo, para além do facto do controlo interno da amostra ter sido positivo. Posteriormente,

através da PCR-TR, confirmaram-se estes mesmos resultados, apresentando os leites da primeira e décima segunda semana valores de cargas virais de 16 224,14 e 107 961,28 cópias/mL, respectivamente. Apesar de se ter confirmado o resultado negativo do leite materno na PCR-TR, não se descarta a hipótese de se estar perante um falso negativo. Esta situação poderá ter surgido por más condições de transporte e conservação da amostra até ao seu processamento, pelo que a não refrigeração correcta poderá originar um resultado falsamente negativo, embora esta eventualidade seja pouco frequente com o CMV, quando se utilizam técnicas de biologia molecular.

Relativamente às mães que cumpriram o estudo até à décima segunda semana pós-parto (37 mães, que correspondem a 42 lactentes), a grande maioria, mais precisamente 72,9% (27/37), apresentaram reactivação viral através da glândula mamária. Refira-se que, do total das mães que excretaram o vírus, detectou-se presença de CMV no leite materno em mais de 50% (14/27) na primeira semana pós-parto. Actualmente, há a evidência de que a taxa de incidência da reactivação de CMV no leite das mães seropositivas é elevada variando, nos diversos estudos, entre os 66% (95) e os 96% (57, 69, 86, 89, 109, 150, 159).

Como descrito nos artigos científicos, nem todas as mães excretoras de CMV pelo leite materno transmitem a infecção perinatal. Assim, do total de mães com reactivação viral (27 mães), encontrou-se 11 (40,7%) mães que não transmitiram infecção perinatal até à décima segunda semana pós-parto e 16 (59,3%) possíveis transmissoras de infecção perinatal. Por outras palavras, nem todas as crianças que ingeriram leite com presença de CMV adquiriram, até ao final da recolha das amostras, infecção perinatal. Deste modo, procurou-se encontrar factores que possam contribuir para a aquisição de infecção perinatal por CMV nesta amostra populacional.

Com este objectivo, comparou-se a carga viral do leite materno entre as mães transmissoras e não transmissoras de CMV, nas três diferentes semanas (1^a, 6^a e 12^a semana pós-parto). Com base na análise estatística, na primeira semana pós-parto existe uma evidência, embora fraca, de uma diferença da carga viral entre as mães transmissoras e não transmissoras ($0,05 < p < 0,1$), sendo a carga viral superior no primeiro grupo. Na sexta semana pós-parto, apesar dos dois grupos de mães apresentarem, estatisticamente, pouca ou nenhuma diferença relativamente à mediana

das cargas virais dos leites maternos ($p > 0,1$), foi perceptível uma ligeira tendência para a mediana da carga viral dos leites das mães transmissoras ser superior em relação às outras. (figura 14 e 15). Quanto à décima segunda semana pós-parto, verificou-se que existe uma diferença entre as medianas da carga viral nos dois grupos de mães que, do ponto de vista estatístico, é evidente ($0,01 < p < 0,05$), sendo a carga viral no leite das mães transmissoras superior à das mães não transmissoras (figura 16).

Quanto à excreção viral no leite materno ao longo das doze semanas pós-parto, constatou-se que a sua evolução é semelhante em todas as mães, independentemente de como actua, ou não, na transmissão do vírus. Significa isto que, em ambos os grupos, houve um aumento significativo da primeira para a sexta semana e um decréscimo acentuado até à décima segunda semana. Para além disso, é de salientar que em todas as fases de estudo a mediana da carga viral manteve-se sempre superior no grupo das mães transmissoras de CMV (figura 17).

Com base nos dados, registou-se também um maior número de mães com excreção viral na primeira semana pós-parto no grupo das mães transmissoras (10/16 – 62,5%) em comparação com as não transmissoras (8/25 – 32,0%). Verificou-se, igualmente, que muitas mães deixaram de excretar CMV na décima segunda semana, mantendo-se, no entanto, a superioridade no número de mães com presença de CMV no grupo das transmissoras (5/16 – 31,3%) relativamente às não transmissoras (4/26 – 16,0%). Estas constatações levantam a hipótese das mães transmissoras poderem excretar CMV com maior precocidade e durante um período mais prolongado.

Em relação ao grupo de lactentes com infecção e sem infecção, não foram observadas diferenças significativas entre estes no que diz respeito às suas características antropométricas, tempo de internamento e tipo de parto (tabela 11 e 12).

O tempo de internamento pode ser um factor importante pois, quanto maior a sua duração, maior o risco de infecção nosocomial, incluindo o risco de aquisição de CMV perinatal através da infecção cruzada (por exemplo, más práticas de higiene das mãos dos prestadores de cuidados). Esta forma de transmissão pode ser a justificação para a aquisição de infecção perinatal no lactente que não ingeriu leite materno infectado, pois teve um longo período de internamento (105 dias). Este lactente nasceu de cesariana,

pondo-se de parte a transmissão de CMV através das secreções cervicais, e apresenta uma grande susceptibilidade para a aquisição de CMV, pois é um extremo prematuro (idade gestacional de 25 semanas) com muito baixo peso à nascença (628g). Contudo, a única afirmação segura que se pode extrair deste caso é que o lactente apresenta infecção citomegálica sintomática (com detecção de neutropénia), cuja transmissão não se deu através do leite materno.

Em relação ao tipo de parto, sabe-se que os lactentes, cujo parto foi de cesariana, têm menos um factor de risco de transmissão de CMV perinatal, já que não há contacto com as secreções cervicais da mãe. Neste estudo verifica-se que o tipo de parto na maioria dos nascimentos foi cesariana (76,7%), estando os lactentes que nasceram de parto normal, ou seja, com mais um factor de risco, distribuídos de forma idêntica nos dois grupos (tabela 12).

O único factor discrepante entre os dois grupos foi o número de lactentes submetidos a transfusões sanguíneas. Nesta amostra populacional verificou-se uma maior percentagem de lactentes sujeitos a transfusões sanguíneas no grupo sem infecção perinatal do que no grupo com infecção perinatal, embora de acordo com a análise estatística esta diferença não é muito significativa pois apresentou uma fraca evidência ($0,05 < p < 0,1$). Sabendo que o CMV pode ser transmitido por via iatrogénica, que inclui a transfusão de sangue, todos os lactentes que foram sujeitos a transfusões sanguíneas apresentam maior risco de aquisição de infecção por CMV. Desta forma, se os resultados obtidos demonstrassem o oposto, ou seja, se o maior número de lactentes submetidos a transfusões sanguíneas estivesse no grupo com infecção perinatal por CMV, poderia sugerir a existência de uma variável interferente neste estudo. Como forma de prevenir a transmissão por esta via, todos os hemocomponentes foram previamente desleucocitados antes da sua administração. Com estas medidas preventivas e de acordo com a análise dos dados obtidos, pode-se concluir que a administração de componentes sanguíneos não exerceu influência nos resultados do presente estudo.

De acordo com estudos recentes, o risco de aquisição de infecção citomegálica perinatal é superior nos recém-nascidos extremos prematuros (< 28 semanas de idade gestacional) (18) e com muito baixo peso à nascença ($< 1500g$) (57, 86, 150). No

entanto, na amostra populacional em estudo, não foi demonstrado que a taxa de infecção perinatal estivesse associada ($p > 0,1$), quer com o muito baixo peso à nascença, quer com o grau de extrema prematuridade (tabela 13 e 14), não estando estes resultados em consonância com os dos estudos referidos anteriormente.

Outro factor que neste estudo, estatisticamente, parece não ter uma relação significativa com a aquisição da infecção perinatal por CMV é a duração da amamentação. Apesar de se ter verificado uma maior percentagem de sujeitos com maior tempo de duração da amamentação no grupo dos lactentes infectados (11/16), três destes já se encontravam infectados com CMV desde a sexta semana pós-parto (tabela 15).

É importante discriminar que a grande maioria dos lactentes não ingeria exclusivamente o leite materno (havendo, ocasionalmente, a introdução de leite artificial intercalado com o leite natural, reduzindo indirectamente, a frequência da ingestão deste último) e que, por questões práticas da UCIN e do quotidiano das mães, o leite materno era com muita frequência refrigerado ou mesmo congelado. Neste estudo, não se teve acesso a estas informações de forma individualizada, embora se deva admitir que este factor poderá ter alterado a probabilidade de transmissão. Um lactente, cuja frequência de ingestão de leite materno é reduzida, tem menor contacto com o vírus, logo, apresenta menor risco de aquisição de infecção perinatal (138). Por outro lado, a refrigeração ou congelamento do leite reduz em grande escala a sua carga viral, apesar de não eliminar por completo o vírus presente, havendo um menor risco de transmissão do CMV (87, 124, 129, 159). Segundo Hamprecht (61), nos estudos cujos lactentes ingerem leite materno congelado ou refrigerado, as taxas de transmissão de CMV reduzem em cerca de 6 a 29% em relação aos outros estudos. Assim, estas condições podem influenciar em grande escala os resultados deste estudo, no sentido de poder diminuir a prevalência da infecção perinatal nesta amostra populacional.

Relativamente às manifestações clínicas e/ou laboratoriais da infecção perinatal de CMV adquiridas através do leite materno, foram encontrados seis (37,5%) lactentes com sinais de infecção por CMV, mais concretamente com neutropénia (tabela 16). Contudo, esta alteração foi também detectada em seis (24%) lactentes sem infecção citomegálica, averiguando-se que estatisticamente existe pouca ou nenhuma evidência de uma diferença na presença de neutropénia nos dois grupos de lactentes ($p > 0,1$). A

neutropénia é uma situação relativamente frequente nos lactentes, principalmente nos prematuros e de baixo peso, apresentando uma grande diversidade de causas, entre as quais, as infecções virais, as infecções bacterianas e a administração de fármacos (51). Deste modo, torna-se complexo estabelecer uma relação causa-efeito entre a infecção perinatal de CMV e a neutropénia.

Saliente-se, todavia que, limitações de ordem logística, não permitiram que, imediatamente após a recolha das amostras, se procedesse ao respectivo processamento, pelo que os resultados obtidos foram tardios. Assim, estas limitações impossibilitaram a realização da monitorização das alterações laboratoriais (nomeadamente hematológicas e bioquímicas) de forma sincrónica com a aquisição da infecção. Numa tentativa de contornar estes constrangimentos, optou-se por realizar um estudo retrospectivo, procurando nos processos clínicos dos lactentes alterações clínico-laboratoriais que pudessem estar relacionadas com a infecção citomegálica, o que poderá ter condicionado que algumas destas alterações não tenham sido detectadas.

Neste trabalho, não ocorreram discrepâncias entre os resultados dos leites maternos fornecidos pela *Nested-PCR* e a *PCR-TR*, ou seja, todos os leites positivos detectados pela primeira técnica foram confirmados pela *PCR-TR*, não tendo surgido falsos positivos.

No que se refere aos resultados quantitativos do leite materno é de notar que, apesar da eficiência das reacções de amplificação das sessões de *PCR-TR* encontrar-se dentro dos parâmetros devidos (figura 13), constatou-se que o coeficiente de variação (intra e inter-ensaio) era elevado, principalmente nos controlos de menor concentração viral (tabela 8 e 9). Este facto pode ser devido a uma perda de sensibilidade nos valores de carga viral mais baixos (apesar do limite da sensibilidade desta técnica ter sido previamente determinada nas 200 cópias/mL). Desta forma, quando os resultados foram positivos mas a elevação significativa da linha de base era observada depois do último padrão da curva de calibração, os valores da carga viral são referidos como < 351 cópias/mL.

Ao longo de cerca de quatro décadas, foram desenvolvidos vários estudos, dispersos por todo o mundo, com o fim de determinar o risco de aquisição de CMV, através do leite materno, nos recém-nascidos prematuros e de baixo peso. Comparando estes estudos, as

taxas de prevalência de infecção e doença são extremamente variáveis, podendo ser o reflexo de desenhos de estudos díspares, diferentes definições de infecção e doença por CMV nos recém-nascidos e distintas práticas de alimentação nas diferentes unidades neonatais, particularmente no que respeita à ingestão do leite materno fresco, refrigerado, congelado ou pasteurizado. Apesar de não haver uma imagem clara no que respeita à magnitude do risco de aquisição de infecção perinatal por CMV, todos os estudos consideram que a causa principal de transmissão de CMV é a ingestão de leite materno contaminado. Os factores que ditam quais os recém-nascidos que, ao ingerirem leite materno com presença de CMV, adquirem infecção e doença, mantêm-se pouco claros.

Cabe aqui salientar que o estudo, que agora termina, foi pioneiro, a nível nacional, no que respeita à problemática da transmissão de infecção perinatal por CMV nos lactentes, através do leite materno. Refira-se, todavia que, devido ao reduzido número de sujeitos em estudo, os resultados obtidos podem não representar o panorama nacional. Ainda assim, tendo como referência a amostra analisada, foi possível retirar algumas conclusões significativas que facultam uma melhor compreensão do mecanismo de transmissão de CMV pelo leite materno nos lactentes e suas manifestações clínicas, que de seguida se passa a elencar:

- A taxa de incidência de excreção viral nas mães seropositivas, na amostra em estudo, foi elevada (72,9%), sendo os valores semelhantes aos obtidos por um estudo realizado em Itália (95). Porém, outros autores apresentam uma posição mais extremista, referindo que o número de mães seropositivas para CMV é idêntico ao número de mães excretoras deste mesmo vírus sendo, então, as taxas de incidência de excreção superiores às verificadas no presente estudo, aproximando-se dos 95% (57, 68, 86, 89, 109, 150). Portanto, os resultados agora obtidos indiciam, de forma significativa, que nem todas as mães seropositivas excretam o vírus através da glândula mamária, o que reforça as conclusões do estudo italiano.

- O facto de se ter detectado presença de CMV no leite materno, na primeira semana pós-parto, permite concluir que a reactivação viral na glândula mamária pode surgir precocemente, estando em consonância com estudos realizados anteriormente que, inclusive, referem a existência de CMV no colostro (61, 134). Esta precocidade poderá

mesmo constituir um factor de risco para a transmissão de infecção no recém-nascido, devido à sua condição de prematuro, situação que parece ocorrer no presente estudo dado que, das dezoito mães excretoras de CMV na primeira semana pós-parto, 10 (55,6%) transmitiram a infecção aos seus filhos, dos quais 3 (30%) apresentaram neutropénia. Estes resultados vão ao encontro da afirmação de Hamprecht (57, 61) que defende que o início precoce da reactivação viral no leite está associado a um maior risco de transmissão de CMV e de infecção sintomática para o lactente prematuro.

- A dinâmica da excreção de CMV no leite materno foi semelhante em todas as mães, quer tenham sido transmissoras ou não da infecção, ocorrendo um aumento significativo da carga viral no leite materno, desde a primeira semana até à sexta semana, e consequente decréscimo até à décima segunda semana pós-parto. Estes factos foram também evidentes, em estudos prévios, os quais referem que a excreção viral poderá surgir durante a produção do colostro, atingindo um valor máximo de carga viral entre a quarta e a oitava semana e uma redução acentuada entre a nona e a décima segunda semana pós-parto (60, 61, 69, 159). Apesar da evolução da excreção viral na glândula mamária ser idêntica em todas as mães, este estudo permitiu constatar que existe uma variabilidade individual relativamente ao momento em que ocorre o início do processo de excreção do vírus e aos valores da carga viral no leite materno.

- A aquisição de infecção perinatal de CMV no recém-nascido prematuro ocorreu em 40,5%, sendo muito provável que a via de transmissão em 38,1% do total dos sujeitos tenha sido o leite materno infectado. Assim, conclui-se que a taxa de incidência de infecção citomegálica pelo leite materno é significativa, estando de acordo com os resultados fornecidos pelos investigadores alemães (57, 86) mas em discordância com as equipas de investigação do Japão (159), Tailândia (68), Israel (92) e Canadá (32), que atribuíram ao leite materno um papel pouco relevante na transmissão de infecção perinatal por CMV pois, nos seus estudos, a taxa de incidência determinada encontrou-se abaixo dos 10%.

- À semelhança de estudos anteriores (58, 146) o valor da média da carga viral do leite materno nas mães transmissoras, em todos os períodos analisados, foi superior ao do grupo das mães não transmissoras. Ainda que não tenha sido possível estabelecer uma relação evidente entre a infecção perinatal por CMV no lactente e os factores que

potenciam ou inibem a transmissão desta infecção pelo leite materno, devido à complexidade de factores em presença e à dificuldade em proceder à sua eliminação, este estudo permitiu detectar uma correlação entre a carga viral do leite materno e a transmissão do vírus. Deste modo, deduz-se que, quanto maior a carga viral do leite materno, maior o risco de transmissão.

- Relativamente às consequências desta excreção viral, refira-se que nem todas as mães com reactivação viral de CMV na glândula mamária transmitiram a infecção ao seu filho, como já referido. Dentro do grupo das crianças que adquiriram a infecção, nenhuma apresentou clínica significativa que se possa atribuir à infecção citomegálica. Foram apenas detectadas alterações laboratoriais, nomeadamente a neutropénia (37,5% nos lactentes com infecção), embora esta alteração também se tenha verificado no grupo dos lactentes sem infecção (24%), não existindo diferença significativa entre os dois grupos. Assim, estatisticamente, verificou-se pouca ou nenhuma evidência de uma relação causal entre a infecção perinatal por CMV e a neutropénia. Sabendo que, actualmente, não existe consenso entre os diversos autores, no que se refere à percentagem de lactentes infectados com alterações clínicas ou laboratoriais (variando entre os 0% e os 75%), os valores obtidos neste estudo, encontram-se em consonância com os autores que constatarem ausência de qualquer alteração (159). Pode-se concluir, então, que a infecção perinatal por CMV através do aleitamento materno é, na sua maioria, assintomática e não representa risco significativo em termos de morbilidade e muito menos de mortalidade para o recém-nascido prematuro.

Em suma, neste estudo, o primeiro realizado em Portugal, foi possível determinar que a taxa de incidência da infecção perinatal por CMV nos recém-nascidos prematuros, através do aleitamento materno, não sendo elevada (38,1%), não deve ser ignorada. Este resultado corresponde ao dos estudos da equipa alemã, afastando-se dos obtidos pelos japoneses, isto no que diz respeito à transmissão de infecção citomegálica perinatal. Todavia, no que concerne às consequências clínicas, o presente estudo aproxima-se do ponto de vista dos investigadores japoneses, visto que, de igual modo, não foram detectadas alterações clínico-laboratoriais associadas à infecção em causa. Nesta conformidade, pode-se concluir que, apesar de ocorrer transmissão através do leite

materno, esta não aparenta ter consequências graves para a saúde do lactentes. Sublinhe-se que este facto pode conduzir ao menosprezo da infecção perinatal enquanto doença, o que não é desejável, já que diversos estudos (57, 68, 86) verificaram a presença de alguns casos severos.

Tal como sobejamente salientado, apesar do CMV ser uma causa pouco frequente de doença, entenda-se infecção sintomática, que represente perigo de vida nos recém-nascidos prematuros, estas infecções podem ser ocasionalmente severas. Deste modo, a deterioração clínica nos recém-nascidos prematuros, devido a infecção por CMV através do leite materno, quando severa pode contribuir para o custo e duração do internamento hospitalar, bem como para o aumento do desconforto do bebé e da ansiedade dos pais. Torna-se, pois, imprescindível compreender se se pode atenuar o risco de aquisição de infecção através de simples intervenções, tais como a refrigeração, o congelamento ou a pasteurização do leite materno, sendo de extrema importância analisar, mais aprofundadamente, o impacto de tais intervenções nas propriedades nutricionais e imunológicas do leite.

Também, do que ficou dito, não se deve deduzir que a amamentação, no caso das mães seropositivas para CMV, é desaconselhada, já que os benefícios do leite materno superam o risco de transmissão. De facto, a maioria das mães seropositivas excretam o vírus mas apenas algumas o transmitem e, mesmo quando isso ocorre, as repercussões nos lactentes são, na sua maioria, assintomáticas.

Lamentavelmente, não existe ainda um número significativo de estudos sobre as possíveis sequelas tardias da infecção em causa, pelo que se torna importante o investimento neste tipo de pesquisa, de modo a que exista uma noção exacta da patogenicidade da infecção citomegálica perinatal, através do leite materno.

Sublinhe-se, assim, que o estudo que agora termina, permitiu descortinar novas problemáticas e perscrutar novos caminhos que ficarão em aberto para futuras investigações.

5 – BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA

1. **Akposso, K., E. Rondeau, J. P. Haymann, M. N. Peraldi, C. Marlin, and J. D. Sraer.** 1997. Long-term prognosis of renal transplantation after preemptive treatment of cytomegalovirus infection. *Transplantation*. **63**: 974-976.
2. **Allen, A. A., F. Baquero-Artigao.** 2011. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección postnatal por cytomegalovirus. *Anales de Pediatría*. **74**: 52e1-52e13.
3. **Balkarek, K. B., W. Warren, R. J. Smith, M. D. Lion, R. Pass.** 1993. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. *J. Infect Dis*. **167**: 1433-1436.
4. **Baquero-Artigao, F., A. Méndez, F. del Castillo, R. Velázquez.** 2004. Cerebrospinal fluid beta 2- microglobulin values in perinatally acquired cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. **23**: 891-2;
5. **Baquero-Artigao, F.** 2009. Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. *Anales de la Pediatría*. **71**: 535-547.
6. **Barbi, M., S. Binda, V. Primache, C. Luraschi, C. Corbetta.** 1996. Diagnosis of congenital Cytomegalovirus Infection by detection of viral DNA in dried spots. *Clin Diag Virol*. **6**:27-32.
7. **Barbi, M., S. Binda, V. Primache, S. Caroppo, P. Didò, P. Guidotti, C. Corbetta, D. Melotti.** 2000. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol*. **17**:159-165.
8. **Barbi, M., S. Binda, S. Caroppo, A. Calvario, C. Germinario, A. Bozzi, M.L. Tanzi, L. Veronesi, I. Mura, A. Piana, G. Solinas, L. Pugni, G. Bevilacqua, F. Mosca.** 2006. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. **25** (2):156-159.

9. **Begovak, J., I. Soldo, V. Presecki.** 1988. Cytomegalovirus mononucleosis in children compared with the infection in adults and with Epstein-Barr virus mononucleosis. *J. Infect.* **17**: 121-125.
10. **Bender, H.** 1998. Neonatal Intensive Care, p.209-221. *In* H. Davis, & L. Fallowfield (ed.), *Counselling and Communications in Health Care*. Wiley, London.
11. **Bevot, A., K. Hamprecht, M. Ingeborg, M. Sibylle, M. Goelz, B. Vollmer.** 2011. Long-term outcome in preterm children with HCMV infection transmitted via breast milk. *Acta Paediatrica.* **10**: 1651-2227.
12. **Bjorksten, B., L. G. Burman, P. Château, B. Fredrikzon, L. Gothefors, O. Hernell.** 1981. Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? *BMJ.* **281**: 765-769.
13. **Bland, M.** 2000. *An Introduction to Medical Statistics*. Third Edition, Oxford University Press, London.
14. **Boeckh, M., P. M. Woogerd, T. Stevens-Ayers, C. G. Ray, R. A. Bowden.** 1994. Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *J. Clin Microbiol.* **32**: 832-834.
15. **Boeckh, M., and G. Boivin.** 1998. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol.11, No. **3**: 533-554.
16. **Boppa, S. B., K. Fowler, Y. Vaid.** 1997. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics.* **99**: 409-414.
17. **Bowen, E. F., P. Griffiths, C. C. Davey, V. C. Emery, M. A. Johnson.** 1996. Lessons from the natural history of cytomegalovirus. *AIDS.* **10 Suppl 1**: s37-41.
18. **Bryant, P. et al.** 2002. Cytomegalovirus Transmission from Breast Milk in Premature Babies: does it matter? *Archive Disease Fetal Neonatal.* **87**: 75-77.

19. **Buonuomo P. S., P. Maurizi, P. Valentini, S. Mastrangelo, I. Lazareschi, V. Ridola. *et al.*** 2006. Successful treatment with oral valganciclovir in immunocompetent infant with gastrointestinal manifestations of cytomegalovirus infection. *J. Perinatol.* **26**: 648-9.
20. **Buxmann, H., A. Miljak *et al.*** 2009. Incidence and clinical outcome of cytomegalovirus transmission via breast milk in preterm infants ≤ 31 weeks. *Acta Paediatr.* **98**: 270-276.
21. **Buxmann, H., M. Falk *et al.*** 2010. Feeding of very low birth weight infants born to HCMV – Seropositive mothers in Germany, Austria and Switzerland. *Acta Paediatr.* **99**: 1819-1823.
22. **Caliendo, A., J. Ingersoll, A. Fox-Canale, S. Pargman, T. Bythwood, M. Hayden, J. Bremer, Nell Lurein.** 2007. Evaluation of Real-Time PCR Laboratory-Developed Tests Using Analyte-Specific Reagents for Cytomegalovirus Quantification. *J. Clin Microbiology.* **45**: 1723-1727.
23. **Capretti, M. G., M. Lanari, T. Lazzarotto, L. Gabrielli, S. Pignatelli, L. Corvaglia *et al.*** 2009. Very Low Birth Weight Infants Born to Cytomegalovirus - seropositive Mothers Fed with Their Mother's Milk: a prospective study. *Journal Pediatr.* **154**: 842-848.
24. **Carlson, A., R. Errol, M. Robert.** 2010. Cytomegalovirus infection in pregnancy: Should all women be screened? *Obstet Gynecol.* **3**: 172:179.
25. **Chiavarini, M., P. Bragetti, A. Sensini, E. Cenci, R. Castronari, M. J. Rossi, A. Fantauzzi, L. Minelli.** 2011. Breastfeeding and Transmission of Cytomegalovirus to Preterm Infants. Case Report and Kinetic of CMV-DNA in Breast Milk. *Italian Journal of Pediatrics.* **37**: 6.
26. **Croly-Labourdette, S., S. Vallet *et al.*** 2006. Pilot epidemiologic study of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Arch Pediatr.* **13**: 1015-1021.
27. **Cunha, M. A.,** 2009. Aleitamento Materno e Prevenção de Infecções. *Revista Portuguesa Clínica Geral.* **25**: 356-362.

28. **Deback, C., A. M. Fillet, N. Dhedin, B. Barrou, S. Varnous, F. Najioullah, F. Bricaire, H. Agut.** 2007. Monitoring on human cytomegalovirus infection on immunosuppressed patients using real-time PCR on whole blood. *J. Clin Virol.* **40**: 173-179.
29. **Demmler, G. J., G. J. Buffone, C. M. Schimbor, R. A. May.** 1988. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Infect Dis.* **158**: 1177-84.
30. **Dolan, A., C. Cunningham, R. D. Hector, A. F. Hassan-Walker, L. Lee, C. Addison, D.J. Dargan, D.J. McGeoch, D. Gatherer.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal Gen Virol.* **85**: 1301-1312.
31. **Dollard, S., S. Grosse, D. Ross.** 2007. New estimates of prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* **17**: 355-363.
32. **Doctor, S., S. Friedman, M. S. Dunn, E. V. Asztalos, L. Wylie, T. Mazzulli, et al.** 2005. Cytomegalovirus transmission to extremely low-birth weight infants through breast milk. *Acta Paediatr.* **94**: 53-58.
33. **Drago, L., A. Lombardi, E. Vecchi, G. Giuliani, R. Bartolone, M. R. Gismondo.** 2004. Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of Central nervous system in HIV patients. *BMC Infectious Disease.* **55**: 1-5.
34. **Drew, W. L.** 1988. Diagnosis of Cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis.* **10 (3)**: 468-475.
35. **Drew, W. L.** 2007. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* **20**: 408-411.
36. **Dunn, D. L., J. L. Mayoral, K. J. Gilligham, C. M. Loeffler, K. L. Brayman, M. A. Kramer, A. Erice, J. Balfour, C. V. Fletcher, R. M. Bolman.** 1991. Treatment of invasive cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients with ganciclovir. *Transplantation.* **51**: 98-106.

37. **Farfán, Mauricio J., J. P. Torres, V. A. Vergara, G. Donoso, A. Alba, C. Paris, E. Santolaya.** 2011. Comparación de las técnicas de reacción de polimerasa en cadena en tiempo real y antigenemia para la detección de citomegalovirus en sangre de niños sometidos a trasplantes. *VerChil Infect.* **28 (2):** 113-117.
38. **Fiegl, M., A. Gerbitz, A. Gaeta, H. Campe, G. Jaeger, H. Kolb.** 2005. Recovery from CMV esophagitis after allogeneic bone marrow transplantation using non-myeloablative conditioning: the role of immunosuppression. *J. Clin Virol.* **43:** 219-223.
39. **Field, A.** 2009. *Discovering Statistics Using SPSS.* Third Edition, SAGE Publications, London.
40. **Fowler, K. B., F. P. McCollister, A. J. Dahle, S. Boppana, W. J. Britt, R. F. Pass.** 1997. Progressive and fluctuating hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* **130:** 624-630.
41. **Fowler, K. B., S. B. Boppana.** 2006. Congenital Cytomegalovirus (CMV) Infection and Hearing Deficit. *Journal of Clinical Virology.* **35:** 226-231.
42. **Gallant, J. E., R. Moore, D. D. Richman, J. Keruly, R. E. Chaisson.** 1992. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J. Infect Dis.* **166:** 1223-1227.
43. **Gandhi, M., and R. Khanna.** 2004. Human Cytomegalovirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Treatments. *The Lancet.* **4:** 725-738.
44. **Gessler, P. et al.** 2004. Cytomegalovirus-associated Necrotizing Enterocolitis in a Preterm Twin After Breastfeeding. *Journal of Perinatology.* **24:** 124-126.
45. **Gerna, G., D. Zipeto, M. Parea, M. G. Revello, E. Silini, E. Percivalle, M. Zavattoni, P. Grossi, G. Milanesi.** 1991. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. *Journal of Infectious Diseases.* **164:** 488-498.

46. **Gerna, G., M. Revello, E. Percivalle, F. Morini.** 1992. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein pp65 for optimal quantification of human cytomegalovirus antigenemia. *J. Clin Microbiol.* **30**: 1232-1237.
47. **Ghafari, S. H., N. Obeidi, M. Dehghan, K. Alimoghaddam, A. Gharehbaghian, A. Ghavamzadeh.** 2008. Monitoring of cytomegalovirus reactivation in bone marrow transplant recipients. *Journal of Pathology and Oncology Research.* **14**: 399-409.
48. **Gibson, W.** 2008. Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion, p.187-204. *In* Shenk Thomas, Mark Stinski (editors), *Human Cytomegalovirus*, Springer, Berlin.
49. **Gindes, L., M. Teperberg-Oikawa, D. Sherman, J. Pardo, G. Rahav.** 2008. Congenital Cytomegalovirus infection following primary maternal infection in the third trimester. *BJOG.* **115**: 830-835.
50. **Ginzinger, D. G.** 2002. Gene Quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology.* **30**: 503-512.
51. **Gonçalves, J. et al.** 2010. Perfil hematológico dos neonatos atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **32 (3)**: 219-224.
52. **Graça, A. et al.** 2004. Citomegalovirus – Infecção congénita ou neonatal? *Acta Médica Portuguesa.* **17**: 335-340.
53. **Grangeot-Keros, L., M. J. Mayaux, P. Lebon, F. Freymuth, G. Eugene, R. Stricker, E. Dussaix.** 1997. Value of Cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J. Infect Dis.* **175**: 944-946.
54. **Griffiths, P. D.** 2009. Cytomegalovirus, p.161-198. *In* Arie Zuckerman, Jangu Banatvala, Barry Schoub, Paul Griffiths, Philip Mortimer (ed.), *Principles and Practice of Clinical Virology*, 6^a ed., Wiley-Blackwell, Oxford.

55. **Hamele, M., R. Flanagan, C. A. Loomis, T. Stevens, M. P. Fairchok.** 2010. Severe Morbidity and Mortality with Breast Milk Associated Cytomegalovirus Infection. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. **29**: 84-86.
56. **Hamprecht, K., M. Vochem, A. Baumeister, M. Bonick, C. P. Speer, G. Jahn.** 1998. Detection of Cytomegaloviral DNA in human milk cells and cell free milk whey by Nested PCR. *Journal of Virological Methods*. **70**: 167-176.
57. **Hamprecht, K., J. Mashmann, M. Vochem, K. Dietz, C. P. Speer, G. Jahn.** 2001. Epidemiology of transmission of Cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *The Lancet*. **357**: 513-518.
58. **Hamprecht, K., S. Witzel, J. Maschmann, K. Dietz, A. Baumeister, E. Meketer.** 2003. Rapid detection and quantification of cell-free cytomegalovirus by a high-speed centrifugation-based microculture assay: comparison to longitudinally analysed viral DNA load and pp67 late transcript during lactation. *Journal of Clinical Virology*. **28**: 303-316.
59. **Hamprecht, K., J. Mashmann, D. Muller, K. Dietz, I. Besenthal, R. Goelz *et al.*** 2004. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res*. **56**: 529-535.
60. **Hamprecht, K., J. Mashmann, R. Goelz.** 2005. Breast milk and cytomegalovirus infection in preterm infants. *Elsevier*. **81**: 989-996.
61. **Hamprecht, K., J. Maschmann, G. Jahn, C. F. Poets, R. Goelz.** 2008. Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. *Journal of Clinical Virology*. **41**: 198-205.
62. **Hays, S.** 2007. Cytomegalovirus, breastfeeding and prematurity. *Arch Pediatr*. **14 Suppl 1**: S2-4.
63. **Hernando, S., L. Folgueira, C. Lumbreras, R. S. Juan, S. Maldonado, C. Prieto, M. J. Babiano, J. Delgado, A. Andres, E. Moreno, J. M. Aguado, J. R. Oteló.** 2005. Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplant Proc*. **37**: 4094-4096.

64. **Ho, M.** 2008. The History of Cytomegalovirus and its Diseases. *Medical Microbiology Immunology*. **197**: 65-73.
65. **Hodinka, R. L.** 2003. Human Cytomegalovirus, p. 1304-1316. *In* Patrick Murray and Ellen Jo Baron (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. ASM Press, Washington, D.C.
66. **Huang, Y. C., T. Y. Lin, C. S. Huang, C. Hseun.** 1996. Ileal perforation caused by congenital or perinatal cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* **129**: 931-934.
67. **Ikewaki J, E. Ohtsuka, R. Kawano, M. Ogata, H. Kikuchi, M. Nasu.** 2003. Real-time PCR assay compared to nested PCR and antigenemia assays for detecting cytomegalovirus reactivation in adult T-cell leukemia-lymphoma patients. *J Clin Microbiol.* **41**: 4382-4387.
68. **Jim, W.T., C. H. Shu, N. C. Chiu, H. A. Kao, H. Y. Hung, J. H. Chang, et al.** 2004. Transmission of Cytomegalovirus from mothers to preterm infants by breast milk. *Pediatric Infectious Diseases Journal.* **23**: 848-851.
69. **Jim, W.T., C. H. Shu, N. C. Chiu, J. H. Chang, H. Y. Hung, C. C. Peng, et al.** 2009. High Cytomegalovirus load and prolonged virus excretion in breast milk increase risk for viral acquisition by very low birth weight infants. *Pediatric Infectious Diseases Journal.* **28**: 891-894.
70. **Jobe, A. H.** 2009. CMV transmission in human milk. *J. Pediatr.* **154**: A1.
71. **Junqueira, J. J., T. M. Sancho and V. A. Santos.** 2008. Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. *NewsLab.* **86**: 88-104.
72. **Kanj, S. S., A. I. Sharara, P. A. Clavien, J. D. Hamilton.** 1996. Cytomegalovirus infection following liver transplantation: review of the literature. *Clin Infect Dis.* **22**: 537-549.

73. **Kenneson A., M. Cannon.** 2007. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Microbiol.* **17:** 253-276.
74. **Kotenko, S. V., S. Saccani, L. Izotova, O. Mirochnitchenko, S. Pestka.** 2000. Human Cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog. *Proc National Academic Science.* **97:** 1695-1700.
75. **Kurath, S., G. Halwachs-Baumann, W. Muller.** 2010. Transmission of Cytomegalovirus Via Breast Milk to the Prematurely Born Infant: a Systematic Review. *Clinical Microbiology and Infect.* **16:** 1172-1178.
76. **Kurath, S. and G. Capretti.** 2010. Transmission of Cytomegalovirus Via Breast Milk: How to support breast milk to premature infants and prevent severe infection? *Pediatr Infect Dis.* **29:** 680-681.
77. **Lamounier, Joel A., Z. S. Moulin and C. C. Xavier.** 2004. Recomendações quanto à amamentação na vigência de infecção materna. *Jornal de Pediatria.* **80, nº5:** 181-188.
78. **Lee, C., A. Enright, W. E. Benitz, A. Madan.** 2007. Postnatal Cytomegalovirus Infection from Frozen Breastmilk in Preterm, Low-Birth Weight. *Pediatric Infectious Diseases Journal.* **26:** 276.
79. **Liebhaber, M., N. J. Lewiston, M. T. Asquith, L. Olds-Arroyo, P. Sunshine.** 1977. Alterations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing. *Journal Pediatr.* **91:** 897-900.
80. **Liesnard, C., C. Donner, F. Brancart, F. Gosselin, M. L. Delforge, F. Rodesch.** 2000. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol.* **95:** 881-888.
81. **Ljungman, P., P. Griffiths, C. Playa.** 2002. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* **34:** 1094-1097.
82. **Lodish, H., D. Baltimore, A. Berck, S. L. Zipusky, P. Matsudaira, J. Darnell.** 1997. Chapter 7 - Recombinant DNA Technology. *The Polymerase Chain Reaction: an*

alternative to cloning. p.254-261. *In* Molecular Cell Biology. Scientific American Books, New York.

83. **Lopo, S., E. Vinagre, P. Palminha.** 2004. Vírus Citomegalo. p.101-111. *In* Maria da Graça Freitas e Maria Teresa Paixão (ed.), Avaliação do programa nacional de vacinação. 2º Inquérito serológico nacional – Portugal Continental, 2001 – 2002. DGS, Lisboa.
84. **Lourenço, M. H.** 2002. Capítulo 7- Herpesvírus Humano. p.83-111. *In* W. Ferreira e J. Sousa (ed.), Microbiologia, vol.3. Edições Lidel, Lisboa.
85. **Malm, G., M. L. Engman.** 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Semi Fetal Neonatal Med.* **12**: 154-159.
86. **Maschmann, J. K. Hamprecht, K. Dietz, G. Jahn, C. P. Speer.** 2001. Cytomegalovirus infection of extremely low-birth weight infants via breast milk. *CID.* **33**: 1998-2003.
87. **Maschmann, J. K. Hamprecht, B. Weissbrich, K. Dietz, G. Jahn, C. P. Speer.** 2006. Freeze-thawing of breast milk does not prevent cytomegalovirus transmission to a preterm infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* **91**: 288-290.
88. **Medrone, J.** 2010. Prevalência da infecção pelo Cytomegalovirus: a importância de estudos locais. *Rev. Bras. Hematologia.* **32**: 7-8.
89. **Meier, J., U. Lienicke, E. Tschirch, D. H. Kruger, R. R. Wauer, S. Prosh.** 2005. Human Cytomegalovirus Reactivation during Lactation and Mother-to-Child Transmission in Preterm Infants. *Journal of Clinical Microbiology.* **3**: 1318-1324.
90. **Mello, R., P. M. Obalski, J. Satri, F. Paris, A. B. Machado, M. Senger, M. C. Corrêa, L. C. Júnior, G. Turra, C. M. Souza.** 2008. Comparação dos métodos de Reacção em Cadeia da Polimerase qualitativo e antigenémia pp65 para o diagnóstico de infecção por Citomegalovirus em pacientes imunossuprimidos. *Revista HCPA.* **28**: 16-20.

91. **Mims, D., R. Goering, W. Zuckerman.** 2005. *Microbiologia Médica*. Tradução da 3ª Edição, Elsevier, Rio de Janeiro.
92. **Miron, D., S. Brosilow, K. Felszer, D. Reich, D. Halle, D. Wachtel *et al.*** 2005. Incidence and clinical manifestations of breast milk-acquired Cytomegalovirus infection in low birth weight infants. *Journal of Perinatology*. **25**: 299-303.
93. **Mocroft, A., C. Katlama, A. M. Johnson, C. Pradier, F. Antunes, F. Mulcahy, A. Chiesi, A. N. Phillips, O. Kirk, J. D. Lundgren.** 2000. AIDS across Europe, 1994-1998: the EuroSIDA study. *Lancet*. **356 (9226)**: 291-296.
94. **Moroco, J.** 2003. *Análise Estatística. Com utilização do SPSS*. Editora Sílabo, Lisboa.
95. **Mosca, F., L. Pugini, M. Barbi, S. Blinda.** 2001. Transmission of Cytomegalovirus. *Lancet*. **357**: 1800.
96. **Müller, A., A. M. Eis-Hübinger, G. Brandhorst, A. Heep, P. Bartmann, A. R. Franz.** 2008. Oral valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus infection in an extremely low birth weight infant Valganciclovir for congenital CMV infection. *Journal of Perinatology*. **28**: 74-76.
97. **Murata, H. *et al.*** 2009. Quantitative detection of HCMV-DNA in saliva from infants and breast milk on real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics International*. **51**: 530-534.
98. **Murphy, E., T. Shenk.** 2008. Human Cytomegalovirus Genome, p. 1-20. *In* Shenk Thomas, Mark Stinski (editors), *Human Cytomegalovirus*, Springer, Berlin.
99. **Murray, P., S. Rosenthal, M. Pfaller.** 2009. *Medical Microbiology*. Twentieth Edition. Mosby Elsevier, Philadelphia.
100. **Mussi-Pinhata, M. M., A. Y. Yamamoto, M. A. C. Rego, P. C. Pinto, M. S. Motta, C. Calixto.** 2004. Perinatal or Early-Postnatal Cytomegalovirus Infection in preterm infants under 34 weeks gestation born to CMV-seropositive mothers within a high-seroprevalence population. *Journal Pediatr*. **145**: 685-688.

101. **Nelson, C. T., A. S. Ista, M. K. Wilkerson, G. J. Demmler.** 1995. PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for a congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin Microbiol.* **33**: 3317-3318.
102. **Neto, M. T.** 2006. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. *Acta Pediátrica Portuguesa.* **1, 37**: 23-26.
103. **Neuberger, P., K. Hamprecht, et al.** 2006. Case-control study of symptoms and neonatal outcome of human milk-transmitted cytomegalovirus infection in premature infants. *J. Pediatr.* **148**: 326-331.
104. **Novais, C. M., M. P. Alves.** 2004. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* **33**: 10-13.
105. **Noyola, D. E., G. J. Demmler, W. D. Williamson, C. Griesser, S. Sellers, A. Llorente, T. Littman, S. Williams, L. Jarret, M. D. Yow.** 2000. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. Congenital CMV Longitudinal Study Group. *Pediatr Infect Dis.* **19**: 505-510.
106. **Numazaki, K., S. Chiba, H. Asanuma.** 2001. Transmission of Cytomegalovirus. *The Lancet.* **357**: 1799-1800.
107. **Numazaki, K.** 2005. Human Cytomegalovirus Infections in Premature Infants by Breastfeeding. *African Journal of Biotechnology.* **4**: 867-872.
108. **Okulo, E., I. Akin, B. Atasay, E. Giftci, S. Arsan, T. Turner.** 2012. Severe postnatal cytomegalovirus infection with multisystem involvement in an extremely low birth weight infant. *Journal of Perinatology.* **32**: 72-74.
109. **Omarsdottir, S., C. Casper, B. Wirgart, L. Grillner, M. Vanpée.** 2007. Transmission of cytomegalovirus to extremely preterm infants through breast milk. *Acta Paediatr.* **96**: 492-494.
110. **Ozkan T. B., R. Mistik, B. Dikici, H. O. Nazlioglu.** 2007. Antiviral therapy in neonatal cholestatic cytomegalovirus infection. *J. Pediatr.* **7**: 9.

111. **Paixão, P., E. Cardoso, C. Toscano, A. Lopes, J. Faro-Viana, T. Marques.** 2002. Estudo da avidéz das IgG para o Vírus Citomegálico Humano. *Progressos em Diagnóstico Prenatal*. **14(2)**: 60-65.
112. **Paixão, P., S. Almeida, P. Gouveia, L. Vilarinho, R. Osório.** 2004. Prevalence of Human Cytomegalovirus Congenital Infection in Portuguese Newborns. *Eurosurveillance*. **14 (9)**: 1-3.
113. **Paixão, P., S. Almeida, P. Gouveia, S. Binda, S. Caroppo and M. Barbi.** 2005. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *J. Virol.* **128**: 1-5.
114. **Paixão, P.** 2009. Contributo para o estudo da infecção congénita pelo Vírus Citomegálico em Portugal. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa.
115. **Paixão, P., S. Almeida, P. Videira, D. Ligeiro, T. Marques.** 2012. Screening of congenital cytomegalovirus infection by real-time PCR in urine pools. *Eur J Pediatr*. **171**: 125-129.
116. **Paryani S.G., A. S. Yeager, H. Hosford-Dunn, S. J. Johnson, N. Malachowski, R. L. Ariagno, et al.** 1985. Sequelae of acquired cytomegalovirus infection in premature and sick term infants. *J Pediatr*. **107**: 451-456.
117. **Pass, R. F., K. B. Fowler, S. B. Boppana, W. J. Britt, S. Stagno.** 2006. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J. Clin Virol.* **35**: 216-220.
118. **Pestana, M. H., J. N. Gageiro.** 2005. Análise de dados para Ciências Sociais – A complementaridade do SPSS. 4ª Edição. Editora Sílabo, Lisboa.
119. **Pfaffl, M. W.** 2004. Chapter 3. Quantification strategies in real-time PCR, p.87-112. *In* S. A. Bustin (ed.), *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, USA.
120. **Pigniatelli, S., P. D. Monte, G. Rossini, M. P. Landini.** 2004. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev. Med. Virol.* **14**: 383-410.

121. **Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein.** 2004. Microbiology. 6th edition, McGraw-Hill Higher Education, EUA.
122. **Revello, M. G., G. Gerna.** 2002. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev.* **15**: 680-715.
123. **Revello, M. G., G. Gerna.** 2004. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology.* **29**: 71-83.
124. **Richtmann, R.** 2009. Aleitamento materno e transmissão de infecção: Afinal, o que pode e o que não pode? *Infectologia. Prática Hospitalar*, Ano XI, 65.
125. **Roizman, B., P. E. Pellet.** 2001. Chapter 71: The Family *Herpesviridae*: a brief introduction, p. 2381-2397. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins.
126. **Schalasta, G., M. Eggers, M. Schmid e G. Enders.** 2000. Analysis of Human Cytomegalovirus DNA in urines of newborn and infants by means of a new Ultrarapid Real-Time PCR-system. *Journal of Clinical Virology.* **19**: 175-185.
127. **Schanler, R. J.** 2005. CMV Acquisition in Premature Infants Fed Human Milk: Reason to Worry? *Journal of Perinatology.* **25**: 297-298.
128. **Schleiss, M. R.** 2006. Acquisition of human cytomegalovirus infection in infants via breast milk: natural immunization or cause for concern? *Rev Med Virol.* **16**: 73-82.
129. **Sharland, M., M. Khare, A. Bedford-Russel.** 2002. Prevention of postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* **86**: 140.
130. **Sheen, J. M., H. C. Kuo, H. R. Yu, E. Y. Hueng, C. C. Wu, K. D. Yang.** 2009. Prolonged acquired neutropenia in children. *Pediatr Blood Cancer.* **53**: 1284-1288.

131. **Sheevani, N. J., A. Aggarwal.** 2005. A pilot seroepidemiological study of cytomegalovirus infection in women of child bearing age. *Indian J Med Microbiol.* **23**: 34-36.
132. **Shetty, A; R. Barnes, E. Lazda, C. Doherty, N. Maxwell.** 2007. Cytomegalovirus: a cause of colonic stricture in a premature infant. *J. Infect.* **54**: 37-9.
133. **Silva, F. G.** 2008. Estudo comparativo entre a antigenémia e uma técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico e monitorização das infecções pelo Vírus Citomegálico Humano em doentes transplantados. Tese de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa.
134. **Stagno, S., D. W. Reynolds, R. F. Pass, C. Alford.** 1980. Breast Milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N. Eng. J. Med.* **302**: 1073-1076.
135. **Stagno, S, D. M. Bransfield, M. B. Brown, G. H. Cassell, L. L. Pifer, R. J. Whitley et al.** 1981. Infant pneumonitis associated with Cytomegalovirus, Chlamydia, Pneumocystis and Ureaplasma: a prospective study. *Pediatrics.* **68**: 322-329.
136. **Stagno, S, M. K. Tinker, C. Elrod, D. A. Fuccillo, G. Cloud, A. J. O'Beirne.** 1985. Immunoglobulin M antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. **21**: 930-935.
137. **Stagno, S., R. F. Pass, G. Cloud, W. Britt et al.** 1986. Primary Cytomegalovirus Infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* **256(14)**: 1904-1908.
138. **Stagno, S., and B. Britt.** 2006. Cytomegalovirus, p. 740-781. *In* Remington, J. S., J. O. Klein, C. B. Wilson, C. J. Baker (editors), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infants*. 6th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.
139. **Strauss, J. H., E. G. Strauss.** 2008. *Viruses and Human Disease*. Second Edition, Elsevier Academic Press, New York.
140. **Taylor, G.** 2003. Cytomegalovirus. *An Fam Physician.* **67**: 519-526.

141. **The, T. H., A. P. van den Berg, M. C. Harmsen, W. Bij, W. J. Son.** 1995. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. *J. Infect Dis Suppl.* **99**: 25-29.
142. **Theiler, R. N., A. M. Caliendo, S. Pargman, B. D. Raynor, S. Berga, M. McPheeters, D. J. Jamieson.** 2006. Umbilical cord blood screening for cytomegalovirus DNA by quantitative PCR. *Journal of Clinical Virology.* **37**: 313-316.
143. **Troendle, A. J., G. J. Demmler, W. D. Williamson, J. M. McDonald, A. S. Istas, G. J. Buffone.** 1994. Polymerase chain reaction to detect cytomegalovirus DNA in the cerebrospinal fluid neonates with congenital infection. *J. Infect Dis.* **169**: 1334-1337.
144. **Upton, G., and I. Cook.** 1996. *Understanding Statistics.* Oxford University Press, United Kingdom, Oxford.
145. **Vamvakas, E.C.** 2005. Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis. *Transfusion Med Rev.* **19**: 181-199.
146. **Van Der Strate, S. W. A. et al.** 2001. Viral Load in Breast Milk Correlates with Transmission of Human Cytomegalovirus to Preterm Neonates, but Lactoferrin Concentration Do Not. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* **8**, n°4: 818-821.
147. **Van der Velden, V. H. J., A. Hochhaus, G. Cazzaniga, T. Szczepanski, J. Gabert, J. J. M. Van Dongen.** 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* **17**: 1013-1034.
148. **Varani, S., and M. P. Landini.** 2011. Cytomegalovirus-induced immunopathology and it's clinical consequences. *Herpesviridae.* **2**: 1-14.
149. **Videira, A.** 2001. *Princípios Básicos.* Videira 2001. IV – Reacção em cadeia da polimerase. Videira 2001, p.67-70. *In Engenharia Genética, princípios e aplicações.* Lidel – Edições Técnicas, Lda, Lisboa.

150. **Vochem, M., K. Hamprecht, G. Jahn, C. P. Speer.** 1998. Transmission of Cytomegalovirus to Preterm Infants Thorough Breast Milk. *Pediatric Infect Dis Journal*. **102**: 918-922.
151. **Vollmer, B., K. Seibold-Weiger, C. Schmitz-Salue, K. Hamprecht, R. Goelz, et al.** 2004. Postnatally acquired cytomegalovirus infection via breast milk: effects on hearing and development in preterm infant. *Pediatr Infect Dis J*. **23**: 322-327.
152. **Wakefield, A., J. Fox, A. Sawyerr, J. Taylor, C. Sweenie, M. Smith, V. Emery, M. Hudson, R. Tedder, R. Pounder.** 1992. Detection of Herpesvirus DNA in the Large Intestine of Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Using the Nested Polymerase Chain Reaction. *Journal Med Virol*. **38**: 183-190.
153. **Warren, W. P., K. Balcarek, R. Smith, R. F. Pass.** 1992. Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with virus isolation in tissue culture. *J. Clin Microbiol*. **30**: 786-789.
154. **Weck, K.** 2005. Molecular methods of Hepatitis C genotyping. *Expert Review of Molecular Diagnosis*. **5(4)**: 507-520.
155. **Yager, A.S.** 1974. Transfusion-acquired cytomegalovirus infection in newborn infants. *Am Journal Dis Child*. **128**: 478-483.
156. **Yang, C. W., Y. O. Kim, Y. S. Kim, S. Y. Kim, I. S. Moon, H. J. Ahn, Y. B. Koh, B. K. Bang.** 1998. Clinical course of Cytomegalovirus (CMV) viremia with and without ganciclovir treatment in CMV-seropositive kidney transplant recipients – Longitudinal follow-up of CMV pp65 antigenemia assay. *Am Journal Nephrol*. **18**: 373-378.
157. **Yamamoto, A., L. T. Figueredo, M. M. Mussi-Pinhata.** 1999. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections: clinical aspects, epidemiology, diagnosis and treatment. *Medicina, Ribeirão Preto*. **32**: 49-56.
158. **Yamamoto, A., L. T. Figueredo, M. M. Mussi-Pinhata.** 2009. Infecção perinatal por citomegalovírus: muito frequente mas pouco diagnosticada. *Jornal de Pediatria*. **75, nº2**: 126-130.

159. **Yasuda, A., H. Kimura, M. Hayakawa, M. Ohshiro, Y. Kato, O. Matsuura, *et al.*** 2003. Evaluation of Cytomegalovirus Infections transmitted via breast milk in preterm infants with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Pediatrics Journal*. **111**: 1333-1336.
160. **Zhang, S., Y. H. Zhou, L. Li, Y. Hu.** 2010. Monitoring human cytomegalovirus infection with nested PCR: comparison of positive rates in plasma and leukocytes and with quantitative PCR. *Virology Journal*. **7**: 73.

ANEXOS

ANEXO 1

Interpretação do valor p de acordo com Bland

$p > 0,1$	Pouco ou nenhuma evidência de uma diferença ou relação
$0,05 < p < 0,1$	Fraca evidência de uma diferença ou relação
$0,01 < p < 0,05$	Evidência de uma diferença ou relação
$p < 0,01$	Evidência forte de uma diferença ou relação
$p < 0,001$	Evidência muito forte de uma diferença ou relação